

**Aspekte der plastidären Transkription:
Der Einfluss des Phytohormons Cytokinin und
in vivo-Analysen zur Regulation des *rpoB*-Operons**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Stefanie Hertel
geboren am 04.06.1978 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin in Vertretung
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner
 2. Prof. Dr. Thomas Schmülling
 3. Prof. Dr. Wolfgang Löffelhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juli 2009

ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation der plastidären Transkription stellt einen wichtigen Mechanismus für die Kontrolle der Entwicklung der Chloroplasten als Orte der Photosynthese dar. In dieser Arbeit wurde die plastidäre Genexpression hinsichtlich zweier Aspekte untersucht: der Cytokinineinfluss auf die plastidäre Transkription und ihrer Komponenten sowie eine *in vivo*-Charakterisierung von *PrpoB-345*, des Promotors des *rpoB*-Operons im Tabak, der von der kernkodierten, plastidären Phagentyp-RNA-Polymerase (NEP) erkannt wird.

Cytokinine beeinflussen die Chloroplastenbiogenese und -funktion. Wie Cytokinin seine Effekte in den Plastiden entfaltet, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Um den Einfluss von Cytokinin auf die plastidäre Genexpression zu untersuchen, wurden *run-on*-Transkriptionsassays und quantitative *real-time* RT-PCR von BA-behandelten seneszenten Tabakblättern und sieben-Tage-alten Arabidopsis und Tabakpflanzen durchgeführt. Cytokinin-induzierte Änderungen der plastidären Genexpression scheinen unter circadianer und homöostatischer Kontrolle zu stehen. Zeitreihenanalysen zeigten eine Aktivierung der plastidären Transkription in jungen Pflanzen und im seneszenten Tabak 2 h bzw. 3 h nach BA-Applikation. Abgeschnittene Blätter von Tabakmutanten mit konstitutiv reduziertem Cytokiningehalt antworteten bereits nach 30 min der Hormonbehandlung, was auf ein entwicklungsspezifisches Antwortzeitfenster auf Cytokinin hindeutet. Es scheint sich auch auf Transkriptebene widerzuspiegeln. Vor der transkriptionellen Aktivierung wurden verringerte Transkriptinstabilitäten beobachtet, die auf transkriptionelle/posttranskriptionelle Rückkopplungsmechanismen hinweisen. Weiterhin wurde eine differentielle, z.T. artspezifische, Regulation der plastidären Genexpression beobachtet. Es gibt keinen eindeutigen Hinweis für eine direkte Korrelation zwischen der Expression der nukleär kodierten Phagentyp-RNA-Polymerasen und der BA-induzierten transkriptionellen Aktivierung der Plastidengene. Cytokinin wirkte sich aber auf die *RpoTm*-Transkriptmenge aus, was auf eine Signaltransduktion von Chloroplasten und/oder Zellkern zu den Mitochondrien hindeutet. Zusammengefasst, scheint die Antwort auf exogenes Cytokinin vom physiologischen Status der Chloroplasten, die von der Pflanzenart sowie vom endogenen Cytokiningehalt beeinflusst werden, abzuhängen.

Plastidäre Gene höherer Pflanzen werden von mindestens zwei RNA-Polymerasen transkribiert: die plastidär kodierte RNA-Polymerase vom Bakterientyp (PEP) und die kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerase (NEP). NEP, in Arabidopsis und Tabak durch die zwei Enzyme RpoTp und RpoTnp repräsentiert, transkribiert das *rpoB*-Operon, das drei von vier Untereinheiten der PEP kodiert. Transkriptions- und Transkriptanalysen von *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten ergaben Hinweise auf mögliche Regulationsstellen der Kontrolle der *rpoB*-Transkription. Der *in vitro* charakterisierte *rpoB*-Promotor (*PrpoB-345*) konnte in dieser Arbeit *in vivo* bestätigt werden. Das Ausschalten dieses NEP-Promotors hatte jedoch keine Auswirkung auf die *rpoB*-Transkription *in vivo*. Vielmehr konnten in dieser Studie mindestens zwei weitere Promotoren mittels *Primer Extension*- und der 5'-RACE-Technik kartiert werden. Einer von ihnen ist ein putativer PEP-Promotor, der auf autoregulatorische Rückkopplungsmechanismen bei der PEP-Expression hindeutet und somit neues Licht in die regulatorischen Interaktionen zwischen den kern- und plastomkodierten plastidären RNA-Polymerasen bringen könnte.

Schlagworte:

Tabak, Arabidopsis, Plastidentranskription, RNA-Stabilität, Phytohormone, Cytokinin;
Plastidäre Promotoren, Tabak *rpoB*-Operon

SUMMARY

An important mechanism regulating the development of chloroplasts, the sites of photosynthesis, is regulation of plastid gene transcription. In this study, plastid gene expression was analyzed focusing on two aspects: the effect of cytokinin on plastid gene transcription and its components, and the *in vivo* characterization of *PrpoB*-345, the promoter of the *rpoB* operon in tobacco recognized by the phage-type plastid RNA polymerase (NEP).

Cytokinins are involved in the control of chloroplast biogenesis and function. However, it is not yet understood how this phytohormone unfolds its effect on plastids. To study cytokinin effects on plastid gene expression, chloroplast run-on transcription and quantitative real-time RT-PCR from senescent tobacco leaves as well as Arabidopsis and tobacco seedlings after BA treatment were performed. Analyses of time series revealed that BA-induced changes in plastid gene expression are seemingly under circadian and homeostatic control. After 2 h and 3 h of incubation with cytokinin, a stimulation of chloroplast transcription could be observed in seedlings and senescent leaves, respectively. Detached leaves of tobacco mutants with reduced endogenous cytokinin content responded even faster to BA (30 min) indicating a developmental time-frame of response to cytokinin which seemed to translate into the transcript level. Interestingly, transcript instability occurred prior to transcriptional activation suggesting intertwined transcription/RNA-stability feedback loops. Furthermore, differential, to some extent, species-specific regulation of plastid gene expression by BA could be observed. There is no explicit indication of direct correlation of the expression of nuclear-encoded plastid phage-type RNA-polymerases and the BA-induced transcriptional activation of plastid genes. Surprisingly, cytokinin treatment also affected the mRNA accumulation of the mitochondrial phage-type RNA polymerase indicating a signaling from chloroplasts and/or nucleus to mitochondria. In summary, these experiments led to the conclusion that the responsiveness to exogenous cytokinin depends on the physiological status of chloroplasts influenced by plant species and endogenous cytokinin pool.

Plastid genes of higher plants are transcribed by at least two RNA polymerases: the plastid-encoded eubacterial-type RNA polymerase (PEP) and the nucleus-encoded phage-type RNA polymerase (NEP). NEP, represented in Arabidopsis and Nicotiana by two enzymes (RpoTp and RpoTnp) transcribes the *rpoB* operon encoding three of four subunits of PEP. Transcription and transcript analyses from several *rpoB* promoter deletion mutants indicated putative regulatory sites of control of *rpoB* transcription which may also interact with (cytokinin-regulated) specificity factors. The transcription initiation site deduced from *in vitro* mapping was confirmed *in vivo*. However, mutational analysis of the *rpoB* promoter revealed that impairment of the NEP promoter had no relevance for the expression of the operon *in vivo*. In fact, Primer Extension and 5'-RACE techniques mapped further *rpoB* promoters, possibly maintaining the expression of the operon in these mutants *in vivo*. One of them is a putative PEP promoter, which may imply autoregulatory loops of PEP expression that therefore could shed new light on the regulatory interaction of nuclear-encoded and plastid-encoded plastid RNA polymerases.

Keywords:

Tobacco, Arabidopsis, plastid transcription, RNA stability, phytohormones, Cytokinin;
Plastid promoters, tobacco *rpoB* Operon

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	2
SUMMARY	3
INHALTSVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	1
1.1 Pflanzliche Signalstoffe als Regulatoren von Wachstum, Entwicklung und der Reaktion auf Umwelteinflüsse	1
1.2 Die Phytohormongruppe Cytokinin	1
1.2.1 Struktur, Synthese und Metabolismus	1
1.2.2 Cytokininrezeption und Signaltransduktion	5
1.2.3 Entwicklungsphysiologische Effekte der Cytokinine	6
1.2.3.1 Cytokinin und Licht	6
1.2.3.2 Verzögerte Seneszenz	8
1.2.3.3 Hormonelle Interaktionen	8
1.2.4 Cytokinin und Chloroplasten	9
1.2.4.1 Chloroplastenentwicklung	9
1.2.4.2 Cytokinin-regulierte Genexpression	10
1.2.4.3 Chloroplasten sind autonom im Cytokininmetabolismus	11
1.2.5 Methoden zur Analyse von Cytokinin	12
1.3 Organellen in Pflanzen und die Endosymbiontentheorie	13
1.4 Struktur und Organisation des Tabakplastoms	13
1.5 Organelläre Transkription in höheren Pflanzen	15
1.5.1 Plastidäre Promotoren	16
1.5.2 <i>rpoB</i> -Promotor von Tabak	18
1.6 Zielstellung dieser Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Material	21
2.1.1 Oligonukleotide	21
2.1.2 Plasmide	21
2.1.3 Pflanzenmaterial	22
2.1.4 Bakterienstamm	22
2.1.5 Anbieter	22
2.1.6 Computerprogramme	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 Pflanzenanzucht	23
2.2.2 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> -Kulturen	24
2.2.3 Phytohormonbehandlung mit 6-Benzyladenin (BA)	24
2.2.4 Nukleinsäuren	25
2.2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	25

2.2.4.1.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus Nicotiana	25
2.2.4.1.2	Plasmidisolation aus E. coli	26
2.2.4.1.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Nicotiana, Arabidopsis sowie transplastomen Pflanzenlinien	26
2.2.4.1.4	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	26
2.2.4.2	Natriumacetat-/Ethanol-fällung von DNA und RNA	26
2.2.4.3	Enzymatische Restriktion von DNA	26
2.2.4.4	Elektrophorese von Nukleinsäuren	27
2.2.4.4.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	27
2.2.4.4.2	Agarosegelelektrophorese von RNA	27
2.2.4.4.3	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von cDNA	27
2.2.4.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
2.2.4.6	Klonierung	28
2.2.4.7	Transformation von E. coli	28
2.2.4.8	Sequenzierung	28
2.2.4.9	5'-RACE Analyse von in vivo synthetisierten RNA-Transkripten	29
2.2.4.10	Quantitative real-time RT-PCR	31
2.2.4.11	Blotten von Chloroplastengen	32
2.2.5	Plastidentransformation zur Herstellung von Tabak- <i>rpoB</i> -Promotor-Deletionsmutanten	34
2.2.5.1	Plasmid-Vorbereitung für die Plastid-Transformation	34
2.2.5.2	Biolistische Transformation der Tabakblätter	35
2.2.5.3	Regenerationszyklen	36
2.2.6	Plastidentransformation zur Herstellung der Tabak- <i>rpoB-core</i> -Promotormutanten	36
2.2.6.1	Klonierungsstrategie	36
2.2.6.2	Nachweis der Punktmutation im <i>rpoB-core</i> -Promotor	36
2.2.6.3	Nachweis der Integration des Transgens ins Plastom und Homoplasmietest	36
2.2.7	Southern Blot-Analyse	36
2.2.7.1	Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden und Detektion von DNA	36
2.2.7.2	Membrantransfer	37
2.2.7.3	Regeneration der Membran	37
2.2.8	Primer Extension-Analysen	38
2.2.8.1	Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	38
2.2.8.2	Anlagerung von Oligonukleotiden an RNA	38
2.2.8.3	Synthese und Aufreinigung der cDNA	39
2.2.9	Chloroplastenisolation	39
2.2.10	<i>Run-on</i> -Transkription	39

3	ERGEBNISSE	40
3.1	Auswirkungen der Cytokininapplikation bei <i>Nicotiana tabacum</i>	40
3.1.1	Wahl der Methoden zur Analyse der Transkription sowie Transkriptakkumulation	40
3.1.2	Senescente Blätter vom Wildtyp-Tabak	41
3.1.2.1	Transkription in den Chloroplasten seneszenten Blätter vom Wildtyp-Tabak	42
3.1.2.2	Transkriptakkumulation von psbA, rbcL und rrn16 in den seneszenten Blättern vom Wildtyp-Tabak	46
3.1.2.3	Transkriptakkumulation der Kerngene organellärer RNA-Polymerasen sowie rpoB in den seneszenten Blättern vom Wildtyp-Tabak	48
3.1.3	Sieben-Tage-alte Pflanzen vom Wildtyp-Tabak	49
3.1.3.1	Transkription in den Chloroplasten vom sieben-Tage-alten Wildtyp-Tabak	49
3.1.3.2	Transkriptakkumulation plastidärer Gene sowie nukleärer RpoT-Gene in sieben-Tage-alten Wildtyp-Tabak	52
3.1.4	Auswirkungen der Cytokininapplikation bei cytokinindefizienten Tabakpflanzen	54
3.1.4.1	Einfluss des endogenen Cytokiningehalts auf die Transkription	54
3.1.4.2	Transkriptakkumulation plastidärer Gene sowie nukleärer RpoT-Gene in Nta:AtCKX2-Blättern	59
3.2	Auswirkungen der Cytokininapplikation bei sieben-Tage-alten Wildtyp- und cytokinindefizienten Arabidopsis-Pflanzen	61
3.2.1	Transkription in Chloroplasten von sieben-Tage-alten Wildtyp-Arabidopsis	61
3.2.2	Transkriptakkumulation in den Chloroplasten in sieben-Tage-alten Wildtyp-Arabidopsis	63
3.3	Analyse von <i>rpoB</i> -Promotor-Deletionsmutanten in <i>Nicotiana tabacum</i>	66
3.3.1	Klonierungsstrategie	67
3.3.2	Homoplasmietest der transformierten Pflanzenlinien	69
3.3.3	Analyse der Reportergen-Transkriptakkumulation in den <i>PrpoB</i> -Deletionsmutanten	72
3.3.4	Untersuchung neu initiiierter Reportergentranskripte in den <i>PrpoB</i> -Deletionsmutanten	73
3.3.5	Auswirkungen der Cytokininapplikation bei den <i>PrpoB</i> -Deletionsmutanten	74
3.4	Transgene Tabakpflanzen mit einer Punktmutation im <i>rpoB</i> -core-Promotor-Motiv CAT	77
3.4.1	Sequenzanalyse der transformierten Linien	78
3.4.2	Transkriptionelle Charakterisierung der <i>rpoB</i> -core-Promotormutanten	79
3.4.3	Analyse der 5'-UTR des <i>rpoB</i> -Operons in <i>Nicotiana tabacum</i>	81
3.4.3.1	5'-Transkriptenden mittels Primer Extension-Analyse	81

3.4.3.2	Identifizierung von Transkriptionsinitiationsstartstellen mittels 5'-RACE	84
3.4.3.3	Korrekte Initiation der Transkription in vivo an PrpoB-344/3 im Tabak-Wildtyp	85
3.4.3.4	Identifizierung neuer putativer Transkriptionsstartpunkte mittels 5'-RACE	88
4	DISKUSSION	92
4.1	Cytokinineinfluss auf die Transkription in den Chloroplasten	92
4.1.1	Auf <i>run-on</i> -Assays basierende Transkriptionsanalysen in Plastiden	92
4.1.2	Transkriptions- und Transkriptanalyse von BA-behandelten Pflanzen	93
4.1.3	Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten unbehandelter Pflanzen und differentielle Regulation durch BA	99
4.1.4	Modell: Cytokinineinfluss auf die plastidäre Genexpression in Arabidopsis und Tabak	103
4.2	Analyse der <i>rpoB</i> -Transkription in Tabak	105
4.2.1	Existieren regulatorische Sequenzelemente stromaufwärts und/oder stromabwärts von PrpoB-345?	107
4.2.2	Ein neuer Promotor stromaufwärts des <i>rpoB</i> -Operons?	110
4.2.3	Modell: Transkription von <i>rpoB</i>	116
	LITERATURVERZEICHNIS	118
	ANHANG	136
	DANKSAGUNG	141
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ABA	Abscisinsäure
A.bidest	<i>Aqua bidest</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AHK	Histidin-Kinase aus Arabidopsis
AHP	Histidin-Phosphat-Transfer-Protein aus Arabidopsis
ARR	<i>response regulator</i> aus Arabidopsis
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
(d)ATP	(Desoxy)Adenosintriphosphat
AtIPT	Isopentenyltransferase aus Arabidopsis
BA	6-Benzyladenin
BLAST	<i>Basic alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
(μ)Ci	(Mikro)Curie
CK(s)	Cytokinin(e)
CKXs	Cytokininoxidasen/-dehydrogenasen
CRE1	<i>cytokinin response element 1</i>
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
(d)CTP	(Desoxy)Cytosintriphosphat
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
d	Tag
d.h.	das heißt
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dihydrozeatin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
evtl.	eventuell
G	Guanin
g	Gramm
(d)GTP	(Desoxy)Guanosintriphosphat

h	Stunde
HMBDP	Hydroxymethylbutenyldiphosphat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
iP	Isopentenyladenin
iPRTp	iP-Ribosid-5'-Triphosphat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
l	Liter
MEP	Methylerythritolphosphat
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MS-Medium	Murashige und Skoog Medium
min	Minute
mJ	Millijoule
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	mitochondriales Genom
MVA	Mevalonat
NaAc	Natriumacetat
NEP	Nukleär kodierte (plastidäre) RNA-Polymerase
NO	Stickoxid/Stickstoffmonoxid
Nr	Nummer
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
nt	Nukleotid(e)
(d)NTP	(Desoxy)Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP	Plastidär kodierte (plastidäre) RNA-Polymerase
PHY	Phytochrom
PNK	Polynukleotidkinase
ptDNA	plastidäres Genom
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase/Transkription
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
sog.	sogenannte(r)
T	Thymin
TAP	<i>tobacco acid pyrophosphatase</i>
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
TIS	Transkriptionsinitiationsstelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
(d)TTP	(Desoxy)thymidintriphosphat
tZ	<i>trans</i> -Zeatin
U	Uracil
U	Unit
u.a.	und andere/unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultra violett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
v.a.	vor allem
Vol	Volumen
W	Wochen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WOL	<i>wooden leg</i>
wt	Wildtyp
Z	Zeatin
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 EINLEITUNG

1.1 Pflanzliche Signalstoffe als Regulatoren von Wachstum, Entwicklung und der Reaktion auf Umwelteinflüsse

Wachstum und Entwicklung der Pflanze hängen von der Koordination und Transduktion einer Vielzahl von endogenen und umweltbedingten Reizen ab. Diese resultieren in Veränderungen von Genexpressionsmustern sowie posttranskriptionellen Modifikationen und ermöglichen somit der Pflanze als sessil lebender, vielzelliger Organismus eine lokale sowie systemische Adaptation an sich ändernde endogene Reize sowie Umweltbedingungen. Als Signalstoffe wurden frühzeitig Auxin, Ethylen, Cytokinin, Gibberellinsäure und Abscisinsäure identifiziert. Sie werden auch als klassische Phytohormone bezeichnet. Erst in jüngerer Vergangenheit wurden weitere Signalstoffe entdeckt, die charakteristische Wirkungsspektren von Phytohormonen aufweisen. Hierzu gehören u.a. Salicylsäure, Jasmonsäure und Brassinosteroide. Phytohormone sind bereits in sehr niedrigen Konzentrationen ($\sim 10^{-9}$ M) wirksam und üben eine Vielzahl von pleiotropen Effekten in der Pflanze aus. Dabei besteht ein komplexes Netzwerk der gegenseitigen Regulation, in dem sich die einzelnen Phytohormone in unterschiedlichen Prozessen sowohl synergistisch als auch antagonistisch beeinflussen können (Gazzarini und McCourt, 2003). Wachstum und Entwicklung werden jedoch nicht nur durch ein ausbalanciertes Gleichgewicht gleichzeitig anwesender Regulatormoleküle gesteuert. Wechselbeziehungen auch zu externen Faktoren wie Licht bestimmter Wellenlänge, Temperatur, Nährstoffangebot, Verwundung, Pathogenen und anderen Elicitoren sind von entscheidender Bedeutung (Nordström et al., 2004; Weiler, 2003; Sweere et al., 2001; Vandenbussche et al., 2007).

1.2 Die Phytohormongruppe Cytokinin

Der Name der Verbindungsgruppe ist von der Wirkung auf die Zellteilung (= Cytokinese) abgeleitet. Nach der Isolation von Kinetin aus autoklavierter Hering-Sperma-DNA (Miller et al., 1955), folgte die erstmalige Extraktion von pflanzlichem Cytokinin aus *Zea mays* L., woher sich auch der Name „Zeatin“ ableitet (Letham, 1963). Dieses Phytohormon ist eines der am häufigsten vorkommenden, natürlichen Cytokinine in höheren Pflanzen.

1.2.1 Struktur, Synthese und Metabolismus

Natürliche Cytokinine sind Adeninderivate und können bezüglich der Konfiguration ihrer N⁶-Seitenkette als Isoprenoid- oder aromatische Cytokinine klassifiziert werden (Abbildung 1.1).

Cytokinine (CK) mit einer ungesättigten Isopentenylseitenkette sind N⁶-Δ²-Isopentenyladenin (iP) sowie in hydroxylierter Form *trans*-Zeatin (tZ), *cis*-Zeatin (cZ) und Dihydrozeatin (DZ). Unter ihnen sind iP und tZ sowie deren Riboside die vorherrschenden Cytokinine. Dabei gibt es zwischen den Pflanzenarten, Geweben und Entwicklungsstadien signifikante Unterschiede in der Verteilung diverser Cytokinine (Haberer und Kieber, 2002). Aromatische Verbindungen, z.B. Benzyladenin (BA) und seine hydroxylierten Topoline, kommen nur in wenigen Pflanzenspezies vor (Strnad, 1997). Cytokinine existieren als freie Nukleobasen, Riboside und Ribotide mit variierender biologischer Aktivität. Die freien Basen und ihre Riboside gelten hierbei als biologisch aktive Verbindungen (Haberer und Kieber, 2002).

Die früher akzeptierte Annahme, dass Cytokinin nur in den Wurzelspitzen produziert wird, trifft dieser Tage nicht mehr zu. Synthetisiert werden und wirken sie an verschiedenen Orten in der Pflanze, d.h., in sich aktiv teilenden Zellen wie Wurzel, Kambien, Endosperm, Knospen, jungen Früchten, keimenden Samen und Kallusgewebe (Srivastava, 2002). Eine inverse Korrelation wurde zwischen Blattalter, Menge und Syntheserate von Z-Typ Cytokinin gefunden (Nordström et al., 2004). Das Vorkommen von tZ im Xylem und iP im Phloem lassen auf ein selektives Transportsystem schließen. Damit wirken CKs nicht nur als lokale, sondern auch als Langstreckensignale. Die entsprechenden biologischen Informationen sind womöglich in den verschiedenen Strukturen der Seitenketten enthalten (Hirose et al., 2008). Die Translokation von CKs wird von einer Untergruppe der Permeasen und Nukleotidtransporter vermittelt, die sich die Purin- bzw. Zuckerkonjugattransportsysteme teilen (Gillissen et al., 2000; Hirose et al., 2005; Bürkle et al., 2003). Laut Nordström et al. (2004) werden Cytokinine dagegen sowohl im Spross als auch in der Wurzel produziert, was einen Wurzel-Spross-Transport als alleinigen, wichtigen Mechanismus für das Aufrechterhalten des Cytokiningehalts im Spross ausschließt. Zunehmend gibt es Hinweise auf eine komplementäre Regulation zwischen den Makronährstoffen Nitrat, Phosphat und Sulfat und Cytokinin in der Akquisition und Verteilung von Nährstoffen (Miyawaki et al., 2004; Sakakibara, 2006; Franco-Zorrilla et al., 2004; Franco-Zorrilla et al., 2005; Franco-Zorrilla et al., 2002; Maruyama-Nakashita et al., 2004).

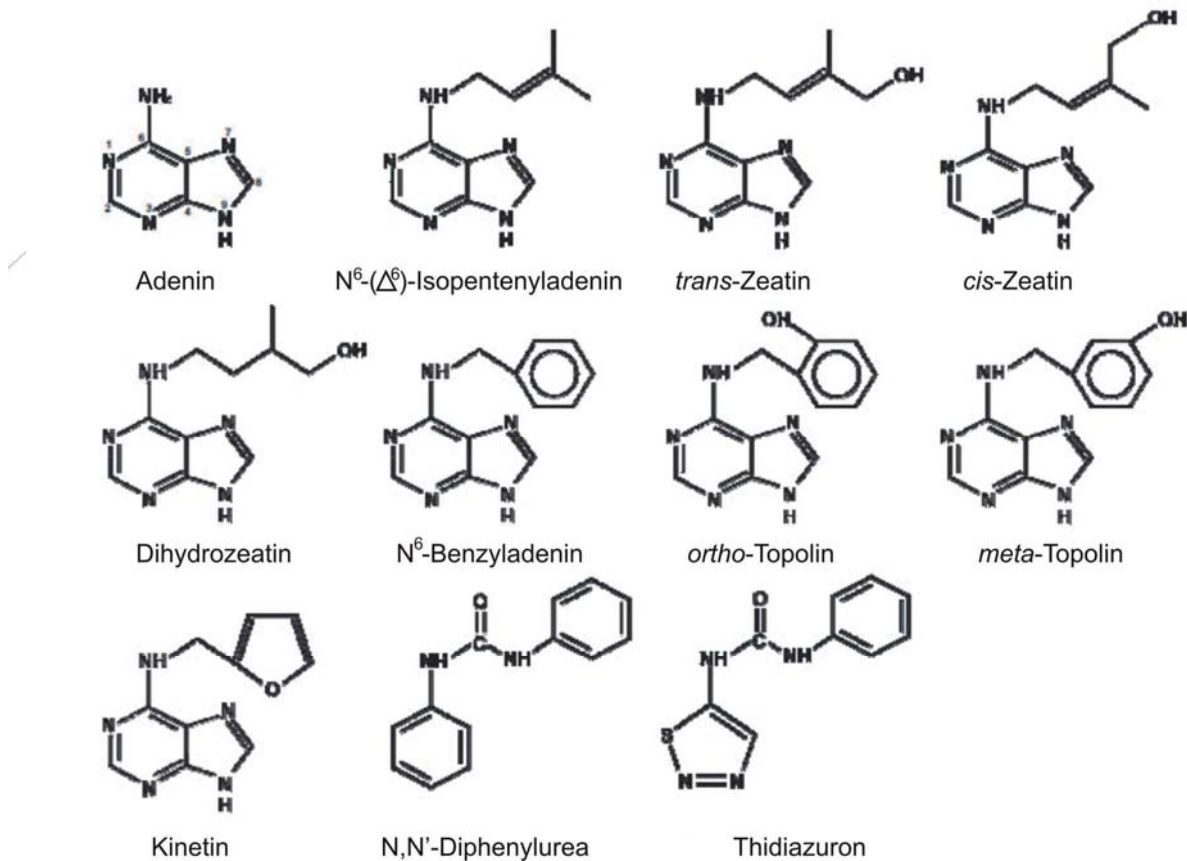


Abbildung 1.1: Struktur natürlich vorkommender Isopentenyl- und aromatischer Cytokinine. Unter den Isoprenoid-Cytokinen gehören N⁶-(Δ^6)-Isopentenyladenin (iP), *trans*-Zeatin (tZ), *cis*-Zeatin (cZ) und Dihydrozeatin (DZ). Dabei sind iP und tZ sowie deren Riboside die vorherrschenden natürlichen Cytokinine in höheren Pflanzen. Zu den aromatischen Cytokinen gehören N⁶-Benzyladenin (BA), Topoline und Kinetin. Letzteres ist im humanen Urin enthalten. Bislang gibt es aber keinen Hinweis für das Vorkommen in Pflanzen (Überblick in Mok und Mok, 2001; Sakakibara, 2006). Verschiedene synthetische Derivate besitzen auch Cytokininaktivität (z.B. Diphenylurea, Thidiazuron).

Arabidopsis besitzt sieben Gene für ADP/ATP-Isopentenyltransferasen (*AtIPT1*; *AtIPT3* bis *AtIPT8*) und zwei Gene für tRNA-IPTs (*AtIPT2* und *AtIPT9*, Miyawaki et al., 2004; Takei et al., 2004; Kakimoto, 2001b; Golovko et al., 2002). Während Erstere für den Großteil der Synthese von iP und tZ-Typ Cytokinen verantwortlich sind, vermitteln die tRNA-IPTs während der Reifung von tRNA-Spezies die Produktion von cZ-Typ Cytokinen (Miyawaki et al., 2006). Die *AtIPT*-Gene weisen gewebe- und organspezifische Expressionsmuster auf, wirken aber auch redundant (Kakimoto, 2001a; Miyawaki et al., 2006). Enzyme für die Cytokininproduktion, exprimiert als Fusionsproteine mit GFP, wurden auch in den Plastiden lokalisiert (*AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5*, *AtIPT8*; Kapitel 1.2.4.3). Ein *AtIPT*-Genprodukt mit IPT-Aktivität konnte bisher allerdings biochemisch nicht isoliert werden, womöglich aus Gründen von Instabilität und/oder Sensitivität gegenüber Phosphatasen. Folglich kann über die genauen Schritte und Produkte der Cytokininbiosynthese in Arabidopsis teilweise nur spekuliert werden: Bei der Synthese von iP, tZ, cZ und DZ in höheren Pflanzen katalysieren

Isopentenyltransferasen den Transfer einer Isopentenylgruppe von einem Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) an ATP bzw. ADP. Dabei entstehen die Produkte iP-Ribosid-5'-Triphosphat (iPRTP) und iP-Ribosid-5'-Diphosphat (iPRDP), die als Vorläufer für viele verschiedene Formen natürlich vorkommender Cytokinine dienen (Kakimoto, 2001b; Sakakibara et al., 2005). DMAPP wird sowohl über den Methylerythritolphosphatweg (MEP) in den Plastiden als auch über den Mevalonatweg (MVA) im Cytosol synthetisiert. Die tZ-Nukleotide können auch direkt über Hydroxymethylbutenyldiphosphat (HMBDP) als Isopentenyl-Donor gebildet werden. HMBDP ist ein metabolisches Zwischenprodukt des MEP-Synthesewegs, das nur in Bakterien und Plastiden vorkommt. Ein kürzlich entdeckter Syntheseweg entlässt aktive Cytokininformen direkt aus den Nukleotiden, katalysiert von einer Nukleosid-5'-Monophosphat-Phosphoribohydrolase (LOG, Kurakawa et al., 2007). Die funktionellen Unterschiede zwischen den Synthesewegen müssen noch aufgeklärt werden.

Die Menge aktiver Cytokininmoleküle kann durch reversible O-Glykolysierung, Ribosylierung, Phosphoribolysierung, aber auch irreversibel durch N-Glykolysierung sowie durch das Abtrennen der ungesättigten N⁶-Isopentenylseitenkette von Adenin mittels Cytokininoxidasen (CKXs) reguliert werden (Auer et al., 1999; Mok und Mok, 2001; Sakakibara, 2006). Bis heute ist noch nicht eindeutig geklärt, ob diese verschiedenen Cytokininformen nicht auch den Grad der Hormonwirkung modulieren können (Haberer und Kieber, 2002). Cytokininoxidaseaktivität ist in verschiedenen Geweben höherer Pflanzenarten anzutreffen (Armstrong, 1994). Im Arabidopsis-Genom konnten sechs Cytokininoxidase/-dehydrogenase-Gene identifiziert werden. CKXs agieren selektiv. Bevorzugte Substrate sind freie iP- und Z-Basen und deren Riboside. Sie sind jedoch nicht in der Lage, N⁶-Seitenketten mit Einfachbindungen sowie mit Glykosylresten und aromatischen Ringen zu spalten. Deswegen gehören unter den synthetisch und natürlich vorkommenden Cytokinin Kinetin und N⁶-Benzyladenin (BA) zu den stabilen und physiologisch aktiven Cytokinin (Mok und Mok, 2001). In physiologischen und transplastomen Studien finden sie deshalb oft als exogenes Agens Verwendung.

Werner et al. (2001) schalteten vor die Gene für Cytokininoxidasen/-dehydrogenasen (CKXs) den konstitutiv aktiven *cauliflower mosaic virus* 35S RNA Promotors (35S Promotor), um so den endogenen Cytokiningehalt in Tabak zu reduzieren (Abbildung 1.2). Infolge dessen waren in Abhängigkeit der Tabaklinien die endogenen Cytokininmengen auf zwischen 30% und 60% der des Wildtyps verringert. Den Beobachtungen zur Folge, beeinflussten Cytokinine die Zellproliferation in Meristemen negative in der Wurzel- und positiv in der Sprossentwicklung. Interessanterweise zeigten die transgenen Tabakpflanzen

eine reduzierte Apikaldominanz und langsamer fortschreitende Seneszenzerscheinungen. Dies stellt die Annahme in Frage, dass Cytokinine in Pflanzen allgemein Seneszenz verzögern und das Wachstum lateraler Knospen fördern (siehe auch Kapitel 1.2.3.2).

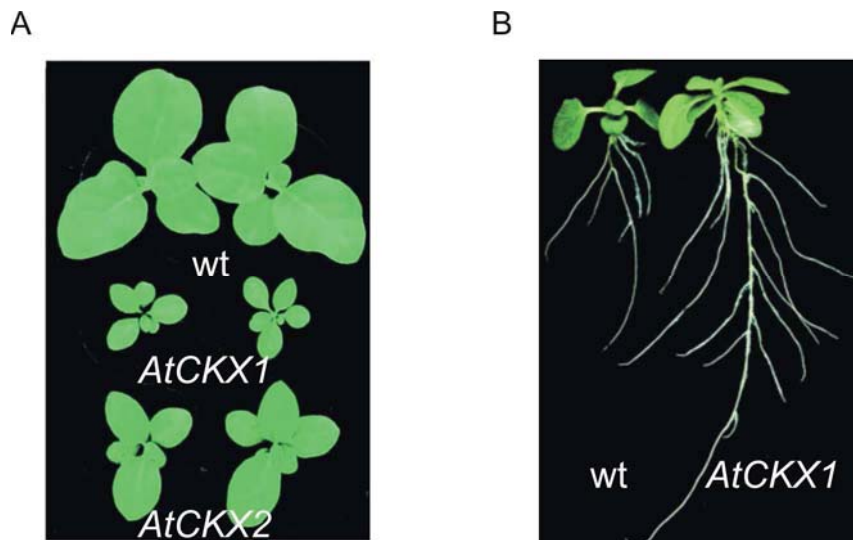


Abbildung 1.2: Phänotyp von *AtCKX1*- und *AtCKX2*-überexprimierenden Tabakpflanzen. (A) Aufsicht auf den Spross von 6-Wochen-alten Pflanzen. (B) Wurzelwachstum von jungen Pflanzen 17 Tage nach der Keimung. Cytokinin-oxidasen/-dehydrogenasen (CKXs) spielen in Pflanzen eine wichtige Rolle in der Regulation von Hormonmengen, indem sie Cytokinine irreversibel abbauen. Cytokinindefiziente Tabakpflanzen wurden gewonnen, in denen *CKX*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* unter der Kontrolle des 35S Promotors überexprimiert sind. Cytokinindefizienz verursacht ein verkümmertes Sprosswachstum mit kurzen Internodien, welches zum Zwergenwachstum führt. Das Wurzelwachstum ist hingegen verstärkt. Aus Werner et al. (2001).

1.2.2 Cytokininrezeption und Signaltransduktion

In den letzten Jahren sind die Hauptkomponenten der Cytokininrezeption und Signaltransduktion aufgedeckt und analysiert worden (Überblick in Ferreira und Kieber, 2005). Ein Zwei-Komponenten-Kreislauf im Cytokininsignaltransduktionsweg in *Arabidopsis thaliana* wurde identifiziert. Er gleicht dem prokaryotischen Zwei-Komponenten-System, ist jedoch komplexer: Die Cytokininrezeption durch eine Familie von drei Sensor-Histidin-Kinasen AHK2, AHK3 und AHK4/CRE1/WOL (Inoue et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Ueguchi et al., 2001; Yamada et al., 2001; Mähönen et al., 2000) löst eine Phosphorylierungskaskade aus, bei der es zur Phosphatübertragung auf Histidin-Phosphat-Transfer-Proteine (AHPs) kommt (Suzuki et al., 2002). Deren Translokation in den Zellkern verursacht eine Aktivierung von B-Typ *response regulator*-Proteinen (B-Typ *ARRs*). Im *Arabidopsis*-Genom sind 11 B-Typ-*ARRs* kodiert, charakterisiert durch eine Bindedomäne und einem C-Terminus mit einer Transkriptionsfaktorfunktion (Kiba et al., 1999; Hwang und Sheen, 2001; Sakai et al., 2000). B-Typ-*ARRs* können als Antwort auf Cytokinin wiederum die Transkription sogenannter A-Typ-*response regulator*-Genen aktivieren (Hwang und

Sheen, 2001). Im Arabidopsis-Genom wurden 10 solcher A-Typ-ARRs als primäre Cytokinin-responsive Gene identifiziert (Brandstatter und Kieber, 1998; D'Agostino und Kieber, 1999; Imamura et al., 1998). Die Charakterisierung der Cytokininantworten von Typ-A-ARR *loss-* and *gain-of-function* Mutanten in Arabidopsis zeigten, dass Typ-A-ARRs als negative Regulatoren der Cytokinin-signaltransduktion wirken können, indem sie über einen Rückkopplungsmechanismus ihre eigene Expression (Hwang und Sheen, 2001) unterdrücken. Es wird angenommen, dass sie mit der Inhibition der Transkription die transiente Induktion von Cytokinin-responsiven Genen limitieren und/oder der Feinabstimmung der Signaltransduktionswege dienen.

1.2.3 Entwicklungsphysiologische Effekte der Cytokinine

Cytokinine sind essentielle Signale in unterschiedlichsten entwicklungsphysiologischen Prozessen. Eine zentrale Rolle spielen sie bei der Förderung des Teilungswachstums und der Differenzierung von Pflanzengeweben. Cytokinine verlangsamen Seneszenzerscheinungen, stimulieren die Blattentwicklung sowie die Induktion der Blütenbildung und Fruchtentwicklung (Bernier, 2005; Mok, 1994; Mok et al., 1987; Adamaska und Kloppstech, 1994; Deikman, 1997; Kumar et al., 2004). Darüber hinaus werden viele Aspekte der Biogenese und Funktion von Chloroplasten von Cytokinin beeinflusst. Sie unterstützen die Entwicklung von lichtexponierten Pflanzen, wirken auf die Effizienz des Photosyntheseapparates (Lerbs et al., 1984; Kraepiel und Miginiac, 1997; Thomas et al., 1997) sowie auf die photomorphogenetische Pflanzenentwicklung von etiolierten Keimlingen (Harvey et al., 1974; Caers und Vendrig, 1986). Außerdem beeinflussen sie den Nährstofftransport, die Stresstoleranz und die pathogene Abwehr (Mok und Mok, 2001; Kakimoto, 2003; Letham, 1994; Mok, 1994). Cytokininaktionen sind jedoch oft durch Interaktionen mit anderen Phytohormonen maskiert, weshalb die phänotypischen Antworten auf erhöhte Cytokininkonzentrationen gelegentlich widersprüchlich und damit schwer zu interpretieren sind.

1.2.3.1 Cytokinin und Licht

Licht als wichtiger externer Stimulus und Cytokinin als endogenes Hormonsignal sind entscheidend für fast alle Aspekte der Entwicklung von höheren Pflanzen. Bereits Miller (1956) beobachtete Gemeinsamkeiten in Kinetin- und Rotlichteffekten. Im Laufe der Jahre konnte schließlich in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass Cytokinin Licht in seinen Antworten nachahmt, z.B. die Inhibierung der Hypokotylelongation, die Umwandlung von

Etioplasten zu Chloroplasten, die Blühinduktion, vermehrte Zellteilungen im Sprossmeristem sowie Transkriptmengen von Licht-regulierten Genen (Chin-Atkins et al., 1996; Chory et al., 1994; Thomas et al., 1997).

Unter den Photorezeptoren detektieren die Phytochrome PHYA und PHYB Rotlicht. Sie sind in Dunkelheit im Cytoplasma, im Licht im Nukleus lokalisiert. Der Licht-aktivierte Import in den Zellkern führt dabei möglicherweise zu Änderungen in den Transkriptionsraten (MacKenzie et al., 1975; Sakamoto und Nagatani, 1996; Lin und Shalitin, 2000; Neff et al., 2000). Die Co-Lokalisation mit Cytokinin vom Zeatin-Typ gibt Hinweise auf eine cytokininspezifische Regulation von Lichtantworten (Dewitte, 1999). Jüngere Studien geben zudem Hinweise, dass es sich bei den Phytochromen wie bei den Cytokininrezeptorproteinen des Zwei-Komponenten-System möglicherweise um Histidin-Kinasen handelt. Der gemeinsame evolutionäre Ursprung beider Histidin-Kinase-Typen führte vielleicht zur Bildung potentieller Signalwege für die Cytokinin-vermittelte Regulation von Lichtantworten (Stock et al., 2000).

Rotlicht induziert den aktiven PHY-Zustand, PHY_{fr} und Dunkelheit wandelt den Photorezeptor wieder in den inaktiven PHY_r -Zustand um. Darüber hinaus erhöht Rotlicht die Genexpression des nukleären *response regulator* ARR4. Es wird angenommen, dass die Signalwege von Cytokinin und Licht auf der Ebene von ARR4 sowie Phytochrom B konvergieren und somit durch Verhindern der „Dunkelumwandlung“ PHY_{fr} stabilisieren (Rashotte et al., 2006; Hwang und Sheen, 2001; Sweere et al., 2001). Möglicherweise agieren sie durch gemeinsame Signaltransduktionszwischenprodukte und kontrollieren somit dieselben *downstream*-Antworten (Chory et al., 1994). Salomé et al. (2006) weitete die Interaktionen zwischen ARR4 und PHYB auf die Regulation der circadianen Uhr aus. Weiterhin besitzt Licht einen positiven Einfluss auf die Cytokininakkumulation (Kraepiel und Miginiac, 1997; Lejeune et al., 1988; Machácková et al., 1998; Puttonen und Arnott., 1994; Rosenthal und Camm, 1996). Die Transkription von vielen plastidären Genen wird von Licht und Cytokinin beeinflusst (Parthier, 1979; Kusnetsov et al., 1994; Kimura et al., 2003; Rashotte et al., 2005; Bracale et al., 1988). Trotz der intensiven Erforschung von Cytokininregulation und Lichtantworten sind bis heute die Zwischenschritte zwischen Lichtrezeption, Hormonaktion und den physiologischen Antworten noch nicht eindeutig aufgeklärt worden.

1.2.3.2 *Verzögerte Seneszenz*

In einer Reihe von Studien mit Cytokininbehandlung wurde eine Rolle des Hormons beim Verzögern von Blattseneszenz gezeigt (Gan und Amasino, 1995; Kim et al., 2006; Richmond und Lang, 1957; Mothes und Engelbrecht, 1961; Thimann, 1980 ; Singh et al., 1992). So stimulierten Cytokinine die Chloroplastenbildung, die Photosynthese und die Replikation von Plastiden (Van Staden et al., 1988; Zavaleta-Mancera et al., 1999b). Des Weiteren führte eine gesteigerte endogene Cytokininmenge in transgenen Pflanzen mit überexprimierenden Cytokininbiosynthesegenen zu verzögerten Seneszenzerscheinungen, zu einem erhöhten Chlorophyllgehalt und zu einem verminderten Seneszenz-assoziierten Membranabbau (Gan und Amasino, 1995; Kim und von Arnim, 2006; Smart et al., 1991; Li et al., 1992; McKenzie et al., 1998; Riou-Khamlichi et al., 1999; Ori et al., 1999; Robson et al., 2004; Clark et al., 2004). Wider erwarten, zeigten Cytokininoxidase-überexprimierende Transformanten (*AtCKX2*) ebenso eine höhere Chlorophyllkonzentration und verzögerte Seneszenz (Mýtinová et al., 2006). Diese scheinbar widersprüchlichen Beobachtungen lassen vermuten, dass Cytokinin nicht den einzig bestimmenden Faktor in der Regulation der Seneszenz darstellt (siehe auch Kapitel 1.2.1.).

1.2.3.3 *Hormonelle Interaktionen*

Auxin und Cytokinine sind eines der best-dokumentierten Beispiele von Hormon-Hormon-Interaktionen. Im komplexen physiologischen Netzwerk der gegenseitigen Regulation beeinflussen sich die beiden Phytohormone in unterschiedlichen Prozessen synergistisch, antagonistisch sowie additiv (Coenen und Lomax, 1997). Das Zusammenwirken von Cytokinin und Auxin sowie die relativen Verhältnisse zueinander bestimmen die Morphogenese der Pflanze wie die Entscheidung über die Bildung von Wurzel- oder Sprossgewebe und die Apikaldominanz (Binns, 1994; Moore, 1979; Skoog und Miller, 1957). In zahlreichen Studien ist dokumentiert, dass Auxin den Cytokininmetabolismus reguliert und umgekehrt (Eklöf et al., 1997; Zhang et al., 1995; Nordström et al., 2004; Rashotte et al., 2005). Die nach Cytokininbehandlung erfolgte Aktivierung von einigen Auxin-regulierten Genen wie *IAA3* und *IAA17* (*INDOLEACETIC ACIDINDUCED*) und *SAURs* (*SMALL AUXIN UP RNA*) weist auf eine koordinierte Regulation zwischen diesen beiden Pflanzenhormonen hin (Rashotte et al., 2003). Mutanten mit veränderter Auxin- und Cytokininsignaltransduktion ermöglichten die Identifizierung weiterer gemeinsamer Regulationspunkte innerhalb der hormonellen Interaktionen (Frank et al., 2000; Harrar et al.,

2003). Trotz dieser Beobachtungen bleibt die Frage bisher ungeklärt, wie sich die gegenseitige Regulation auf die Genexpression auswirkt (Rashotte et al., 2005).

Studien der Hormonregulation von Stressantworten fokussieren sich neben Salicylsäure v.a. auf ABA und Ethylen (Bonetta und McCourt, 1998; Leung und Giraudat, 1998; Wildermuth et al., 2001; Schaller und Kieber, 2002; Hoffman et al., 1999). Cytokinin ist dabei einer von vielen Faktoren, der die Synthese von Ethylen induziert (Abeles et al., 1992; Woeste et al., 1999). Dieser gilt wiederum als Regulator des Fruchtreifeprozesses, der Abscission von (Blüten-)Blättern und fördert die Seneszenz (Bleecker und Patterson, 1997). In *Arabidopsis* sind die Ethylenrezeptoren mit ihrer potentiellen Kinaseaktivität im Zwei-Komponenten-System involviert. Demnach dienen diese Signalwege als ein Mechanismus für den hormonellen *Crosstalk* zwischen Ethylen und Cytokinin (Inoue et al., 2001).

Abscisinsäure (ABA) ist eines der Hormone, das neben anderen Funktionen die Pflanzenseneszenz, antagonistisch zu Cytokinin, beschleunigt und die Chloroplastenbiogenese negativ reguliert (Nooden, 1988b; Yang et al., 2002b; Khokhlova et al., 1978). Plastiden spielen ebenfalls eine Rolle bei der Biosynthese von ABA (Koiwai et al., 2004).

1.2.4 Cytokinin und Chloroplasten

1.2.4.1 Chloroplastenentwicklung

Cytokinine sind an vielen Prozessen der Plastidenentwicklung und -funktionen beteiligt. Nach der Identifizierung von Kinetin als pflanzlichem Wachstumsregulator (Miller et al., 1956), konnten neun Jahre später Stetler und Laetsch (1965) das Mitwirken von Kinetin bei der Chloroplastenreifung in Tabakzellkulturen nachweisen. Nach weiteren 29 Jahren zeigten Chory et al. (1994) und Kusnetsov et al. (1994), dass die Behandlung mit Cytokinin die Entwicklung der Chloroplasten aus Proplastiden, Etioplasten und Amyloplasten fördert, besonders im Dunkeln. Die Behandlung von Wassermelonen-Kotyledonen mit 6-Benzyladenin (BA) bewirkte im Vergleich zur Kontrolle ein ausgeprägtes Innenmembransystem der Plastiden sowie einen Anstieg in der Plastidenanzahl, Pigment- und Enzymmengen (Longo et al., 1979). In den wieder ergrünenden Plastiden kam es dabei zur Re-Entwicklung von Grana und Stroma. In ergrünenden Tabakblättern stieg der Gehalt an Chlorophyll und Proteinen (Zavaleta-Mancera et al., 1999a; Zavaleta-Mancera et al., 1999b).

1.2.4.2 Cytokinin-regulierte Genexpression

In einer jüngeren Arbeit konnte ein Cytokinineinfluss auf die Plastidentranskription *per se* in der Gerste beobachtet werden (Zubo et al., 2005). Das Modellsystem, basierend auf abgeschnittenen Erstblättern der Gerste, zeigte eine Cytokinin-induzierte Stimulation von Transkripten bestimmter Chloroplastengene in Abhängigkeit von Licht und Blattalter (Zubo et al., 2008). Neben hochregulierten Genen können ebenso runterregulierte Gene beobachtet werden. So kam es nach Cytokininapplikation zu einer Abnahme der Phytochrom-mRNA- und cDNA-Mengen für ein Cytokinin-reprimiertes Gen in Gurkenkotyledonen. In der cytokininsensitiven Chloroplastenmutante von *Physcomitrella patens* waren die Transkriptmengen des plastomkodierten *zfpA*-Gens, welches homolog zum *accD*-Gen in höheren Pflanzen ist, nach Cytokininbehandlung verringert (Cotton et al., 1990; Teramoto et al., 1994; Kasten et al., 1992).

Die Cytokininaktionen in den Plastiden scheinen über die Regulation der Expression von nukleären (u.a. Gene für Komponenten des Photosyntheseapparates) sowie plastidären Genen vermittelt zu werden. So reguliert Cytokinin die mit der Chloroplastenentwicklung assoziierte Expression der nukleären Gene *rbcS* (kleine *rbcL*-Untereinheit der Rubisco) und *cab* (Chlorophyll-a/b-Bindeprotein des Photosystems PSII) in Tabak und Arabidopsis (Abdelghani et al., 1991; Chory et al., 1994). Da Plastiden ihr eigenes Genom sowie ihre eigene Expressionsmaschinerie besitzen, könnte die Art und Weise der Kontrolle von Cytokinin auf die Genexpression unterschiedlicher Natur sein. Regulatorische Prozesse konnten auf transkriptioneller (Liere und Börner, 2007a; Lysenko und Kuznetsov, 2005; Deikman und Hammer, 1995; Lu et al., 1990; Yu et al., 1998; Riou-Khamlichi et al., 1999; Andersen et al., 1996), posttranskriptioneller (Herrin und Nickelsen, 2004; Flores und Tobin, 1986; Deikman und Hammer, 1995; Kusnetsov et al., 1994) sowie auf translationaler und posttranslationaler Ebene gefunden werden (Choquet und Wollman, 2002; Link, 1988; Ohya und Suzuki, 1988; Jackowski et al., 1987; Yakovleva et al., 1992; Romanov, 1990; Sherameti et al., 2004).

In globalen Genexpressionsstudien konnten sowohl hoch- als auch runterregulierte Cytokinin-responsive Gene in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium identifiziert werden. (Hoth et al., 2003; Che et al., 2002; Rashotte et al., 2003). Weitere Studien weisen auf sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss von Cytokinin auf die Transkriptakkumulation einzelner Gene in den Plastiden hin (Lerbs et al., 1984; Stabel et al., 1991; Masuda et al., 1994; Hande und Jayabaskaran, 1996; Kasten et al., 1997; Brenner et al., 2005). So detektierten Brenner et al. (2005) in einer Genom-weiten Expressionsprofilanalyse in sieben-

Tage-alten Arabidopsis-Pflanzen schnell Cytokinin-induzierte plastidäre Transkripte. Die schnelle Aktivierung lässt entweder auf einen schnellen Signaltransfer in die Plastiden oder auf eine direkte Rezeption des Cytokininsignals durch die Plastiden schließen.

Kasten et al. (1997) zeigten einen Einfluss von Cytokinin auf die Akkumulation von kern- und plastomkodierten plastidären Proteinen; ein weiterer Beleg dafür, dass beide genetische Kompartimente in der Cytokininaktion involviert sind. So waren u.a. in den Plastiden der cytokininsensitiven Chloroplastenmutante PC22 drei Homologe des kernkodierten *Enhancer*-Proteins OEE2 des *oxygen-evolving complex*, vier Isoformen der plastomkodierten Phosphoglyceratkinase (EC 2.7.2.3) und ein Polypeptid für die β -Untereinheit der Chloroplasten-ATPase (EC 3.6.1.34) in ihren Proteinmengen durch Cytokinin beeinflusst. Eine mögliche Funktion dieser Polypeptide bei der organellären Teilung und Zelldifferenzierung wurde diskutiert. Die Rubiscomenge schien hingegen unbeeinflusst von der Cytokininapplikation zu sein, obwohl von einer Cytokininregulierung auf Transkriptionsebene für *rbcL* und *rbcS* berichtet worden ist (1994; Reski et al., 1991). Trotz des fehlenden Cytokinineffekts auf plastidäre Transkripte in Lupinenkotyledonen scheint die Akkumulation der entsprechenden Proteine differentiell reguliert zu sein (Kusnetsov et al., 1994).

Der Cytokinineffekt auf die Genexpression in den Chloroplasten wird möglicherweise durch hormonelle Interaktionen mit spezifischen Proteinen vermittelt. Kulaeva et al. (2000) beobachtete die Stimulation der Transkription in Gerste-Chloroplasten durch ein Cytokinin-bindendes Protein. In Kombination mit tZ erhöht das Zeatin-bindende Protein (ZBP_Ch1; 64 kDa) die RNA-Synthese in den Chloroplasten. In der Doppelkombination von tZ und ZBP_Ch1 wurde auch eine erhöhte RNA-Synthese in den Lupinenblättern detektiert (Lyukevich et al., 2002b). Im heterologen Transkriptionssystem war dabei der physiologische Zustand der Pflanze der Hauptfaktor der Regulation und nicht die Artspezifität von ZBP_Ch1.

1.2.4.3 Chloroplasten sind autonom im Cytokininmetabolismus

Das Vorkommen von Cytokinin in den Plastiden wurde erstmals durch an Chloroplasten-tRNAs gebundene Cytokinine im Spinat nachgewiesen (Vreman et al., 1978). Die Detektion von Zeatin-Typ-Cytokinin erfolgte schließlich in Spinat-Chloroplasten mittels Papier-Chromatografie und Sojabohnenkallusassays (Davey und Van Staden, 1981). Mit LCMS (*liquid chromatography/mass spectrometry*) wurde ein breiter Umfang an CK-Metaboliten in

den Chloroplasten bestätigt (Benková et al., 1999). Aber erst der Hinweis auf eine plastidäre Lokalisierung von vier Isopentenyltransferasen (AtIPT1, AtIPT3, AtIPT5, AtIPT8) mittels GFP-Fusionsexperimenten ergab einen Anhaltspunkt für die wichtige Bedeutung von Cytokinin in der Chloroplastenentwicklung (Kasahara et al., 2004). So wird die Isopentenylgruppe von tZ und iP hauptsächlich durch den in den Plastiden lokalisierten MEP-Syntheseweg produziert. Auch fanden Sakakibara et al. (2005) heraus, dass in Pflanzen mit transgener IPT von *Agrobacterium tumefaciens* diese trotz des fehlenden Transitpeptids in die Plastiden importiert wird und dort aktiv ist. Die durch den Licht-induzierten *rbcS* Promotor aus *Pisum sativum* (*Pssu-ipt*) vermittelte Überexpression der AtIPT korrelierte mit einer erhöhten Anomalie in der Ultrastruktur von Chloroplasten (Synková et al., 2006). Interessanterweise stieg jedoch die Menge von tZ und iP in den Chloroplasten im Vergleich zu den Kontrollblättern in einem viel geringeren Maß. Gleiches konnten Polanská et al. (2007) bei der Überexpression des *Sho*-Gens, welches für ein Protein aus *Petunia hybrida* mit Homologie zu den Isopentenyltransferasen kodiert, im Tabak verzeichnen. Demnach wird in Z-Typ- und iP-Typ-Cytokinin überexprimierenden Pflanzen die Hauptmenge an Cytokinin außerhalb der Chloroplasten gebildet. Darüber hinaus weist diese Beobachtung auch auf eine Autonomie der Chloroplasten in der Regulation des Cytokininmetabolismus hin. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Reduktion der O-Glykosidmengen in den Chloroplasten bei der Überexpression der Plastiden-lokalisierten Mais β -Glykosidase. In den Tabakblättern konnten keine signifikanten Änderungen in den Mengen detektiert werden (Polanská et al., 2007). Weiterhin scheint für die *de novo*-Cytokininproduktion das Vorhandensein von Chloroplasten Voraussetzung zu sein (Nordström et al., 2004). Die subzelluläre Verteilung der Cytokininbiosynthese spielt offenbar eine wichtige Rolle in der hormonellen Homöostase.

1.2.5 Methoden zur Analyse von Cytokinin

Die Cytokininregulation von Wachstum und Entwicklung der Pflanzen ist in Studien auf zahlreichen Wegen analysiert worden: Phytohormonapplikation an verschiedenen Pflanzen mit einer Korrelation zwischen resultierenden Phänotypen und bekannten Mutanten (Jeffcoat, 1977; Venglat und Sawhney, 1996; Chory et al., 1994); die Analysen von Cytokinin-überexprimierenden oder -responsiven Mutanten (Chaudhury et al., 1993; Deikman, 1997); transgene Pflanzen mit erhöhten (Estruch et al., 1991; Rupp et al., 1999; Huang et al., 2003) oder verringerten Cytokininmengen (Werner et al., 2003; 2001). In den letzten Jahren wurden zudem in Microarraystudien erste Transkriptdaten Cytokinin-responsiver Gene gewonnen (Che et al., 2002; Howell et al., 2003; Rashotte et al., 2003).

Obwohl neun *IPT*-Gene in *Arabidopsis* mit einer Rolle in der Cytokininbiosynthese gefunden worden sind, bleiben ihre genauen Funktionen innerhalb der Synthesewege aufgrund funktioneller Redundanz bisher noch unverstanden. Diese Redundanz ist möglicherweise auch ein Grund für die bisher fehlenden IPT-defizienten Mutanten. Da somit noch Schwierigkeiten beim kontrollierten Ändern von endogenen Cytokininmetaboliten existieren, bleibt die exogene Behandlung immer noch eine wichtige Methode zur Analyse von Cytokinineffekten. Zeatin ist das meist-produzierte Cytokinin in Pflanzen. Dennoch wird BA für die Behandlungen verwendet. Es ist ein synthetisches Cytokinin, welches von Cytokininoxidasen nicht inaktiviert werden kann, starke biologische Aktivität besitzt und deutlich sichtbare Entwicklungsantworten induziert (Nandi et al., 1989).

1.3 Organellen in Pflanzen und die Endosymbiontentheorie

Die genetische Information in Pflanzenzellen ist in drei unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert: Nukleus, Mitochondrien und Plastiden. Gemäß der Endosymbiontentheorie gehen Mitochondrien auf einen α -proteobakteriellen Vorgänger zurück. Das wahrscheinlich ursprünglichste der bisher bekannten mitochondrialen Genome ist das der Protozoe *Reclinomonas americana* (Lang et al., 1997). Die Plastiden hingegen sind aus urtümlichen, frei lebenden Cyanobakterien-ähnlichen Organismen hervorgegangen (Gray, 1992; Gray, 1993; Howe, 1992; Whatley, 1993; Herrmann, 1997). Im Einklang mit dieser Theorie weisen beide Organellen noch Reste des eubakteriellen Genoms sowie Merkmale der prokaryotischen Genexpressionssysteme auf. Im Zuge der eukaryotischen Zellevolution kam es zum „endosymbiontischen Gentransfer“ in den Zellkern, einhergehend mit einer Reduzierung des plastidären (Plastom) und mitochondrialen (Chondrom) Genoms bis auf 5-10% ihrer ursprünglichen Größe (Martin und Herrmann, 1998; Hess und Börner, 1999; Stegemann und Bock, 2006). Verbunden mit dem Gen-Export ist der Re-Import nukleärer Genprodukte in die Organellen, einschließlich zahlreicher Komponenten der organellären Biogenese und Funktion. Damit stehen Mitochondrien und Chloroplasten als semiautonome Organellen unter der Kontrolle des Zellkerns. Umso bedeutender ist die Koordination zelltyp- und entwicklungsabhängiger Stoffwechselgeschehen in den verschiedenen Kompartimenten für deren Funktion.

1.4 Struktur und Organisation des Tabakplastoms

Plastiden höherer Pflanzen enthalten als genetisch semiautonome Organellen ihr eigenes Genom in Form doppelsträngiger, zirkulärer und superhelikaler DNA-Moleküle, die in Abhängigkeit vom Alter und physiologischem Zustand der Blätter in ca. 10-10000 Kopien pro

Organell vorliegen (Palmer, 1985; Baumgartner et al., 1989; Boffey und Leech, 1982). Dabei scheint die Anzahl an Plastomkopien artspezifisch reguliert zu sein. Des Weiteren gibt es bezüglich der Anzahl an Plastiden zell- und gewebsspezifische Unterschiede (Zoschke et al., 2007). Die Größen des Plastidengenoms (Plastom) liegen in Abhängigkeit vom Organismus zwischen 120 und 160 kb (Bungard, 2004; Mullet, 1993). Das Plastom liegt in den Plastiden als Nukleoid vor und verfügt über einen eigenen Translationsapparat (Link, 1994). Infolge dessen ist seine Translation vom Kerngenom unabhängig.

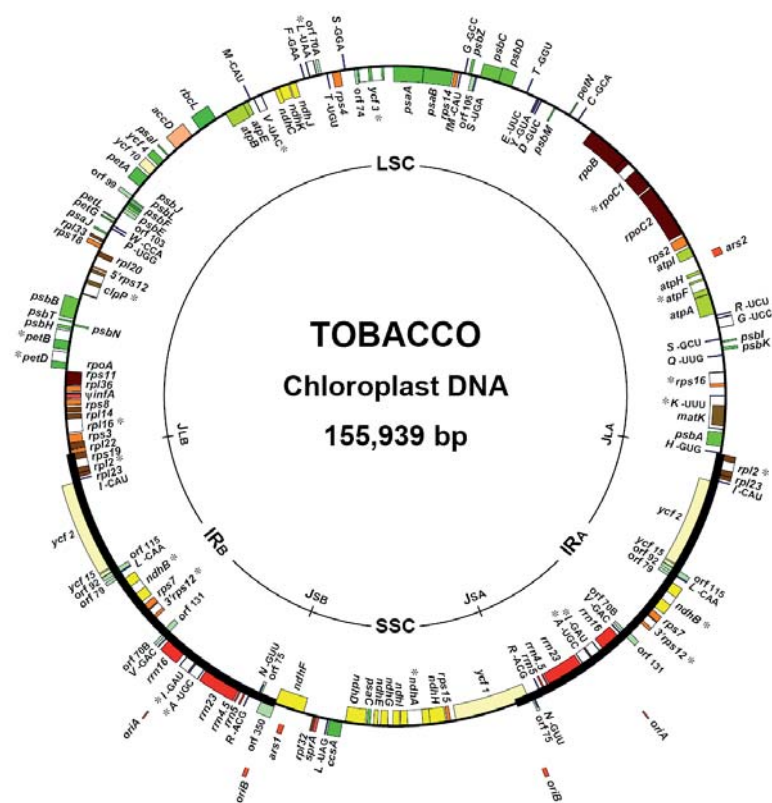


Abbildung 1.3: Genkarte des Tabakplastoms. Das Plastom ist 155943 bp groß. Es wird in LSC (*Large Copy Region*, 86686 bp) und SSC (*Single Copy Region*, 18571 bp) durch IRs (*Inverted Repeat Regions*) geteilt. Die Gene innerhalb des Kreises werden im Uhrzeigersinn, Gene außerhalb des Kreises in Gegenrichtung transkribiert. Die *tRNA*-Gene sind durch das jeweilige Antikodon und Ein-Buchstaben-Abkürzung der Aminosäure angegeben. *Open Reading Frames* (ORFs) unbekannter Funktion werden als *ycfs* (*hypothetical chloroplast reading frames*) bezeichnet. Aus Wakasugi et al. (2001).

Gene mit ähnlichen Funktionen im Plastom sind in Operons organisiert (Sugiura, 1992). Typische Strukturmerkmale des Plastoms sind die *Inverted Repeat Regions* (IR), die das Plastidenchromosom in eine kleine (SSC = *Small Single Copy*) und eine große Einzelkopieregion unterteilen (LSC = *Large Single Copy*; Abbildung 1.3). Die IR-Regionen sind ca. 6 bis 76 kb lang und enthalten unter anderem die rRNA-Gene (Shinozaki et al., 1986). Die IR-Regionen tragen mit großer Wahrscheinlichkeit zur Stabilität des Plastoms bei

(Perry et al., 2002). Das Plastom kodiert für rRNAs, tRNAs sowie Proteine, die in der Transkription, Translation und Photosynthese involviert sind (Link, 1996). Trotz Reduzierung des Plastoms gibt es eine Reihe neuer Charakteristika, die im Laufe der Zellevolution hinzugewonnen wurden: RNA-Edition (Miyamoto et al., 2002), Verbreitung von Introns (Cavalier-Smith, 1991; Lambowitz und Belfort, 1993), nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerasen (NEPs) und einige Gene (*ycf 1/2/14/15*; *hypothetical chloroplast reading frames*) mit unbekannter Funktion (Drescher et al., 2000).

1.5 Organelläre Transkription in höheren Pflanzen

Höhere Pflanzen besitzen neben einer plastidenkodierten plastidären RNA-Polymerase (PEP) vom Bakterientyp kernkodierte Phagentyp-RNA-Polymerasen (kurz als RpoT-Polymerasen bezeichnet). Die Kernuntereinheit von PEP ist durch vier Plastidengene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* spezifiziert. Sie weist signifikante Ähnlichkeiten mit drei Genen auf, die den Kern der eubakteriellen RNA-Polymerase bilden (Überblick in Igloi und Kössel, 1992). Die für die Transkriptionsinitiation durch PEP essentiellen Sigma-ähnlichen Faktoren sind im Nukleus kodiert und werden posttranslational in die Organellen importiert (Allison, 2000). Zusätzlich wurden PEP-assoziierte Polypeptide nukleären Ursprungs in entwicklungsabhängigen Formierungen im Senf identifiziert (Pfannschmidt et al., 2000).

Während PEP auf einen phylogenetischen Vorfahren der Plastiden zurückgeht, ist der phylogenetische Ursprung von NEP noch unklar. Das nukleäre Genom höherer Pflanzen kodiert eine kleine Familie von Genen, die homolog zu den Phagentyp-RNA-Polymerasen-Genen (z.B. T3 und T7) ist. Sie besteht in Arabidopsis und Tabak aus drei Mitgliedern, die in den Mitochondrien (RpoTm), Plastiden (RpoTp) bzw. in beiden Organellen aktiv sind (RpoTmp, Hess und Börner, 1999). RpoTp und RpoTmp gelten als Kandidaten für die NEP-Aktivität (NEP = *nuclear encoded plastid RNA-Polymerase*). Der Ursprung von RpoTp ist sehr wahrscheinlich auf ein Duplikationsereignis des Phagentypgens für die mitochondriale RNA-Polymerase zurückzuführen (Hedtke et al., 1997; Gray und Lang, 1998; Maliga, 1998).

Außerdem gibt es Hinweise, dass einige plastidäre tRNAs von einem Enzym mit Ähnlichkeiten zur nukleären RNA-Polymerase III transkribiert werden könnten (Liere und Maliga, 2001). Bisher konnten mittels *in silico*-Analysen des Arabidopsis-Genoms keine Polymerase dieses Typs mit Plastidenlokalisierung ermittelt werden (Liere und Börner, unveröffentlicht). Aus diesem Grund bleiben die biochemischen Eigenschaften und Enzymbeschaffenheit noch zu bestimmen. Alternativ könnten auch spezialisierte NEP- oder PEP-Enzyme, die mit bestimmten Transkriptionsfaktoren assoziiert sind, die tRNA-spezifischen Promotorstrukturen erkennen und diese tRNAs transkribieren. Darüber hinaus

gibt es Belege für einen weiteren kernkodierten RNA-Polymerase-Typ in den Plastiden, der sich von den Phagentyp-NEP-Enzymen unterscheidet und womöglich in die Transkription des *rrn*-Operons involviert ist (Bligny et al., 2000).

1.5.1 Plastidäre Promotoren

Das Vorhandensein diverser RNA-Polymerasen, die in den Plastiden höherer Pflanzen wirken, wird durch die Existenz verschiedener enzymspezifischer Promotoren komplementiert. Das PEP-Enzym initiiert die Transkription an eubakteriell-ähnlichen Promotoren, die aber bezüglich der klassischen -10 -(TATAaT)/ -35 -(TTGaca) Konsensussequenzen des *E. coli* σ^{70} -Promotortyps variieren können (Übersichten in Grissem et al., 1988; Grissem und Tonkyn, 1993; Link, 1994; Sugiura, 1995; Igloi und Kössel, 1992). Sie interagieren mit Sigma-Faktoren, die eine promotorspezifische Bindung gewährleisten (Tanaka et al., 1996; Tanaka et al., 1997; Isono et al., 1997; Kestermann et al., 1998; Tozawa et al., 1998). Einige PEP-Promotoren besitzen zusätzlich zu diesen *core*-Motiven regulatorische *cis*-Elemente (Liere und Börner, 2007b), die mit kernkodierten Transkriptionsfaktoren interagieren und somit die Transkriptionsaktivität modulieren (Link, 1994; Bown et al., 1997; Satoh et al., 1999; Sun et al., 1989; Iratni et al., 1994; Allison und Maliga, 1995; Kim und Mullet, 1995).

Transkriptionsanalysen von Mutanten mit deletierten PEP-Genen oder Plastiden nicht-photosynthetischer Gewebezellkulturen führten zur Identifikation von NEP-spezifischen Promotoren, die Ähnlichkeiten zu Promotoren aufweisen, die von mitochondrialen und T3/T7-Phagen-RNA-Polymerasen erkannt werden (Allison et al., 1996; Hajdukiewicz et al., 1997; Kapoor et al., 1997; Hübschmann und Börner, 1998; Serino und Maliga, 1998; Silhavy und Maliga, 1998b). Die durch *Primer Extension*- und *in vitro capping*-Experimente mit plastidären Transkripten identifizierten NEP-Promotoren lassen sich aufgrund ihrer Architektur und konservierten Sequenzmotiven drei Klassen zuordnen (Abbildung 1.4) (Übersichten in Weihe und Börner, 1999; Liere und Maliga, 2001). NEP-Promotoren der Klasse I können durch ein konserviertes YRTA-Motiv innerhalb einer AT-reichen Sequenz von etwa 15 Nukleotiden unmittelbar vor der Transkriptionsinitiationsstelle charakterisiert werden. Dieses YRTA-Motiv tritt auch bei Promotoren mitochondrialer DNA höherer Pflanzen auf (YRTAT-Motiv), was die Annahme einer gemeinsamen Herkunft kernkodierter, organellärer RNA-Polymerasen vom Phagentyp unterstützt. Die meisten identifizierten Klasse I-Promotoren weisen 10-20 nt stromaufwärts der YRTA-Box ein zusätzliches etwa 6-7 Nukleotide umfassendes konserviertes Sequenzmotiv (ATAN0-1GAA), die sog. GAA-Box, auf und werden in der Klasse Ib zusammengefasst. Promotoren der Klasse I, die keine GAA-

Box besitzen, werden der Klasse Ia zugewiesen. NEP-Promotoren der Klasse II unterscheiden sich in ihrer Sequenz und Architektur deutlich von Promotoren der Klasse I. Die Transkriptionsinitiation wird hier durch eine konservierte Nukleotidfolge zwischen den Positionen -5 und +25 vermittelt (Sriraman et al., 1998b). Das einzige bisher bekannte Beispiel für einen Klasse II-Promotor ist die transkriptionsinitierende Sequenz des *PclpP*-53-Gens einer ClpP-Proteaseuntereinheit. Die ClpP-Promotorsequenz ist zwischen Monokotylen, Dikotylen, Nacktsamern und Lebermoosen konserviert, was auf ein frühes Auftreten eines NEP-Transkriptionsapparates in der Evolution hindeutet. Dieses Motiv findet sich ebenfalls in Reis und in *Chlamydomonas*, ist bei ihnen jedoch, vermutlich durch das Fehlen zusätzlich notwendiger Transkriptionsfaktoren, inaktiv (Sriraman et al., 1998b).

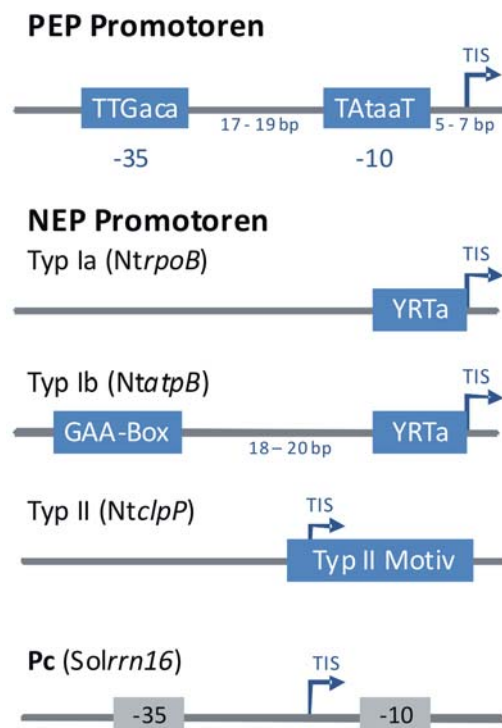


Abbildung 1.4: Konsensussequenzen plastidärer Promotoren. Abgebildet sind die Konsensussequenzen eines plastidären PEP-Promotors eubakteriellen -35/-10- σ^{70} -Typs und der plastidären NEP-Promotoren des Typs Ia, Ib und II sowie des so genannten Pc-Promotors, angegeben mit den jeweiligen Vertretern in Klammern. Das -35/-10-Sequenzmotiv des Pc-Promotors in Spinat ist für die Transkriptionsinitiation nicht essentiell (siehe Text). Der Transkriptionsinitiationsstartpunkt (TIS) ist durch einen Pfeil markiert. Y: Pyrimidin, R: Purin, A: Adenin, T: Thymin, G: Guanin, C: Cytosin. Aus Thiem (2008). Nach Liere und Börner (2007b).

Weiterhin wurden Promotoren detektiert, die zwar von den bekannten Konsensussequenzen abweichen, dennoch wahrscheinlich von einer kernkodierten Transkriptionsaktivität erkannt werden. Zu nennen ist der Pc-Promotor der *16S rRNA*, welcher in Spinat und Arabidopsis, nicht jedoch in Tabak aktiv ist sowie Promotoren einiger tRNA-Gene, die auch vor einem

PEP-freien Hintergrund transkribiert werden (Hess und Börner, 1999; Liere und Maliga, 2001; Baeza et al., 1991; Iratni et al., 1994; Iratni et al., 1997; Sriraman et al., 1998b; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007).

Aus der Verteilung und Nutzung von PEP- und NEP-Promotoren kann eine Arbeitsteilung abgeleitet werden. Einige Gene oder Operons werden vermutlich entweder von PEP oder NEP transkribiert, wohingegen andere von beiden Enzymen transkribiert werden (Hajdukiewicz et al., 1997). Es wurde angenommen, dass PEP die Transkription von Komponenten des Photosyntheseapparates übernimmt, wohingegen NEP vorherrschend die Gene für die Komponenten des plastidären genetischen Apparates transkribiert (Hajdukiewicz et al., 1997; Maliga, 1998). Konsistent damit ist die deutliche Reduzierung in der Akkumulation von Transkripten einer ausgewählten Gruppe von Photosynthesegenen in solchen Pflanzen, denen PEP fehlte (Allison et al., 1996; Hajdukiewicz et al., 1997). Analysen von *run-on*-Transkriptionsaktivitäten in PEP-defizienten Plastiden zeigten jedoch, dass die meisten Segmente des plastidären Chromosoms, unabhängig von PEP- oder NEP-Genen, trotz PEP-Mangels transkribiert werden (Krause et al., 2000). Demnach sind die funktionellen und phylogenetischen Implikationen der multiplen Transkriptionsmaschinerien in den Plastiden höherer Pflanzen offensichtlich komplexer als anfangs vermutet.

1.5.2 *rpoB*-Promotor von Tabak

Das *rpoB*-Operon, welches für die β -, β' -, β'' -Untereinheiten der PEP kodiert, wird ausschließlich von einem NEP-Promotor aus transkribiert (Silhavy und Maliga, 1998a). *In vitro*-Deletions- und Punktmutationsstudien mit nicht-photosynthetischen $\Delta rpoA$ -Plastiden-Extrakten identifizierten ein kleines Drei-Nukleotid-Motiv ('CRT') an der Position -6 bis -8 als NEP-Promotor (PrpoB-345, Liere und Maliga, 1999a). Er ist innerhalb eines kleinen AT-reichen Sequenzbereiches (< 20 bp) lokalisiert und erstreckt sich dabei von -14 bis +1 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle. Mutationen in dieser Region führten *in vitro* zu einer signifikanten Reduzierung der NEP-Aktivität (< 30%). Das Motiv CAT findet sich in der YRTA-Sequenz von NEP-Promotoren der Klasse I wieder (Kapitel 1.5.1). Entgegen den Daten von Inada et al. (1997) konnten außerhalb des *rpoB*-Promotors keine regulatorischen Elemente detektiert werden. In diesem Transkriptionssystem enthalten die $\Delta rpoA$ -Plastiden-Extrakte demgemäß eine aktive NEP und alle Spezifitätsfaktoren für eine effiziente *in vitro*-Transkription. Nachteil von *in vitro*-Systemen sind jedoch oft schwache und relativ labile Enzymaktivitäten. Außerdem können während der Isolierung transkriptionsaktiver Plastiden-Extrakte potentielle, regulierende Faktoren verloren gehen (Liere und Maliga, 1999a).

Eine starke Expression von *rpoB* wurde in Proplastiden von unreifen Reisblättern beobachtet (Inada et al., 1996). Weiterhin konnten Baumgartner et al. (1993) eine Regulierung der Transkription des *rpoB*-Operons in der Gerste zeigen. Dabei erreicht *rpoB* in sehr jungen Blättern seine maximale Abundanz. In der weiteren Chloroplastenentwicklung kommt es jedoch zu einer schnellen Verringerung seiner mRNA-Menge. Zu diesem Zeitpunkt werden Transkriptmengen von Genen verstärkt gebildet, die für Untereinheiten des Photosyntheseapparates (z.B. *rbcL*, *atpB*) kodieren. Die Beobachtungen stehen im Einklang mit einem Anstieg der plastidären RNA-Polymerase (PEP) während der Chloroplastenbiogenese in Hirse (*Sorghum vulgare*, Schrubar et al., 1990). Interessant ist hierbei, dass mit NEP eine kernkodierte RNA-Polymerase über die Verfügbarkeit von PEP-Enzymen und indirekt über die Transkription plastidärer Gene entscheidet. Kritische Faktoren für die frühe *rpoB*-Transkription wurden bisher noch nicht identifiziert.

1.6 Zielstellung dieser Arbeit

Zahlreiche Arbeiten beschreiben einen regulierenden Einfluss von Cytokinin auf verschiedene Entwicklungsprozesse, wie die Entwicklung und Funktion von Chloroplasten. Trotz mehrerer beschriebener Cytokinineffekte auf die Transkription in den Chloroplasten sind bis heute die molekularen Mechanismen der Cytokininaktionen in den Plastiden noch nicht detailliert verstanden. Erschwert wird die Aufklärung durch Studien, die mit unterschiedlichen Pflanzenspezies sowie abweichenden Wachstumsbedingungen durchgeführt werden. Ein Vergleich zwischen den Ergebnissen ist daher nahezu unmöglich. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit eine Serie von Experimenten durchgeführt werden, um Cytokinineffekte auf die Transkription sowie Transkriptakkumulation in den Chloroplasten von *Arabidopsis* und Tabak zu analysieren. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit ein Einfluss auf kernkodierte Komponenten der Transkription (RpoTp und RpoTnp), des Entwicklungsstadiums der Pflanze, der Pflanzenspezies sowie des internen Cytokiningehalts erkennbar wird.

Der Promotor für das *rpoB*-Operon kodiert für drei der vier Kernuntereinheiten der plastidären RNA-Polymerase PEP. Seine Expression und Regulation ist daher für die Entwicklung der Pflanze von großer Bedeutung. Um die Regulation der PEP-Expression zu verstehen, sollten *in vivo*-Analysen des Promotors für das *rpoB*-Operon durchgeführt werden. Die Expression dieses Operons und damit der plastidär kodierten RNA-Polymerase PEP wird offenbar durch die Transkriptionsaktivität der NEP kontrolliert (Hajdukiewicz et al., 1997). Um die Bedeutung der Expression des *rpoB*-Operons in der plastidären Biogenese zu analysieren, sollten Mutanten mit einer Punktmutation in dem beschriebenen NEP *rpoB*-

Promotor von Tabak (Liere und Maliga, 1999a) hinsichtlich der *rpoB*-Transkription und der Auswirkung auf die Gesamttranskription durch die PEP untersucht werden. Um darüber hinaus mögliche regulatorische *cis*-Elemente in der *rpoB*-Promotorregion zu identifizieren, sollten transplastome *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten hergestellt und analysiert werden. Zu diesem Zweck sollte ein Einbau chimärer *rpoB*-Promotor::Reporter-gen-Konstrukte mit verschiedenen Sequenzabschnitten des Tabak-*rpoB*-Promotors mit Hilfe der biolistischen Transformation in das Plastom von *Nicotiana tabacum* erfolgen. Die daraus gewonnenen transgenen Pflanzen sollten hinsichtlich der Promotoraktivität sowie der Reporter-gen-Transkriptakkumulation untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Sigma, MP Biomedicals, Serva oder Becton Dickinson bezogen, Radiochemikalien von den Firmen Amersham Buchler sowie Perkin Elmer. Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden in Reinstwasser (USF Purelab Plus System) angesetzt und gegebenenfalls zur Sterilisierung bei 212°C und 55 kPa für 20 min autoklaviert bzw. bei Hitzeempfindlichkeit der Bestandteile steril filtriert. Alle weiteren Materialien sowie Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen sind an entsprechender Stelle in den nachfolgenden Abschnitten angegeben.

2.1.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma oder Eurogentec bezogen. Die Reinigung von Oligonukleotiden, die als Starteroligonukleotide in die PCR (Kapitel 2.2.4.5) eingesetzt wurden, erfolgte durch Entsalzung, die von Oligonukleotiden, die zur Insertion kurzer Sequenzen in Plasmide eingesetzt wurden, durch HPLC. Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms *oligo calculator* http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_calculation berechnet. Die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

2.1.2 Plasmide

Für jede biolistische Transformation wurden 40 µg des entsprechenden Plasmids in einer Endkonzentration von 1,5 bis 2,5 µg/µl benötigt. Dafür wurde das Plasmid nach dem Maxiprep-Protokoll von QIAGEN aufbereitet (Kapitel 2.2.4.1.2). Die Klonierungsstrategie ist in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben.

Tabelle 2.1: Eigenschaften verwendeter Vektorkonstrukte

Plasmid	Insertion	Referenz
pRB94	Plastidäre Gene: <i>psaB</i> , <i>rps14</i> , <i>trnfM</i> , <i>trnG</i> , <i>trnS</i> , <i>ycf9</i> , <i>rrn16</i> -Promotor, <i>psaB</i> -Terminator aus <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>aadA</i> -Gen für die Spectinomycin/Streptomycin-Resistenz (GenBank-Zugang: AJ312392)	(Ruf et al., 2001)
pSH0	<i>rbcL</i> -Terminatorregion aus <i>Nicotiana tabacum</i> (GenBank-Zugang NC_001879, Basenpositionen 59033-59246) in pRB94 kloniert	diese Arbeit
pSH1	Reportergen GUS aus pKL73 in pSH0 kloniert	diese Arbeit
pSH2	Reportergen GFP aus pMAV4 in pSH0 kloniert	diese Arbeit
pSH3	<i>LrbcL</i> (S)-Leadersequenz aus <i>Nicotiana tabacum</i> in pSH1 kloniert	diese Arbeit
pSH4	<i>LrbcL</i> (S)-Leadersequenz aus <i>Nicotiana tabacum</i> in pSH2 kloniert	diese Arbeit
pSH6	<i>rpoB</i> -Promotorregion (-277/+339) ¹ aus <i>Nicotiana tabacum</i> (GenBank-Zugang NC_001879, Basenpositionen 27518-28133) in pSH1 kloniert	diese Arbeit
pSH7	<i>rpoB</i> -Promotorregion (-28/+339) ¹ aus <i>Nicotiana tabacum</i> (GenBank-Zugang NC_001879, Basenpositionen 27518-27884) in pSH1 kloniert	diese Arbeit
pSH15	<i>rpoB</i> -Promotorregion (-277/+6) ¹ aus <i>Nicotiana tabacum</i> (GenBank-Zugang NC_001879, Basenpositionen 27851-28134) in pSH4 kloniert	diese Arbeit
pSH16	<i>rpoB</i> -Promotorregion (-28/+6) ¹ aus <i>Nicotiana tabacum</i> (GenBank-Zugang NC_001879, Basenpositionen 27851-27885) in pSH4 kloniert	diese Arbeit

¹ die angegebenen Zahlen entsprechen dem Abstand in Nukleotiden relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle

2.1.3 Pflanzenmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtyppflanzen waren *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp *Columbia*) und *Nicotiana tabacum* (Ökotyp *Petit Havana*).

Die transgenen Pflanzen mC und mE (*Nicotiana tabacum*, Ökotyp *Petit Havana*) wurden von Frau Dr. J. Legen (FU Berlin), die transgenen *Ath:CKX2* Arabidopsis- und *Nta:AtCKX2* Tabakpflanzen (*Arabidopsis thaliana*, Ökotyp *Columbia*; *Nicotiana tabacum*, Ökotyp *Samsun NN*) von Prof. Dr. Thomas Schmülling (FU Berlin) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Wildtyp-Tabakpflanzen für die biolistische Transformation zur Herstellung der *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten wurden freundlicherweise von Dr. S. Ruf (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm) bereitgestellt (Kapitel 2.2.5).

In Tabelle 2.2 sind die transgenen Pflanzen aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2.2: Eigenschaften verwendeter Pflanzen

Pflanzenlinie	Insertion	Referenz
NtSH-6.2	<i>PrpoB</i> _(-277/+339) ¹ ::GUS (pSH6)	(Teixeira-Schneider, 2007)
NtSH-7.14	<i>PrpoB</i> _(-28/+339) ¹ ::GUS (pSH7)	diese Arbeit
NtSH-15.16	<i>PrpoB</i> _(-277/+6) ¹ ::GFP (pSH15)	
NtSH-16.25	<i>PrpoB</i> _(-28/+6) ¹ ::GFP (pSH16)	
mC	<i>PrpoB</i> -345 _{.8} (CAC) ₋₆ ¹	(Legen, 2002)
mE	<i>PrpoB</i> -345 _{.8} (CAT) ₋₆ ¹	
<i>Nta:AtCKX2</i>	35S:: <i>AtCKX2</i>	(Werner et al., 2001)
<i>Ath:CKX2</i>	35S:: <i>AtCKX2</i>	(Werner et al., 2003)

2.1.4 Bakterienstamm

Für die Vermehrung rekombinanter Plasmide diente *E. coli* TOP10 (Invitrogen) als Wirtsstamm.

2.1.5 Anbieter

Applied Biosystems	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Ambion	Ambion Inc., Austin, USA
Amersham	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Amersham Biosciences	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Amersham Pharmacia Biotech	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Becton Dickinson	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biometra	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
BioRad	Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Biozym	Biozym Diagnostik GmbH, Hameln, Deutschland
Calbiochem	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Clontech	Clontech Laboratories, Heidelberg, Deutschland
DuPont	DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland

Perkin Elmer	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
Epicentre	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
Eurogentec	Eurogentec, Seraing, Belgien
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Labnet	Labnet International Inc., Edison, USA
Macherey-Nagel	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Millipore	Millipore Corp., Bedford, USA
MP Biomedicals	MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland
Pierce	Pierce, Rockford, USA
PeqLab	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Promega	Promega Corp., Madison, USA
QIAGEN	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Retsch	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roth	C. Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Sartorius	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Serva	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Sigma	Sigma Chemical Company, St. Luis, USA
Stratagene	Stratagene, La Jolla, CA, USA
TaKaRa	TaKaRa Bio Europe S.A.S., Saint-germain-en-laye, Frankreich
TosoHaas	TosoHaas GmbH, Stuttgart, Deutschland
USF	USF, Seral Reinstwassersysteme GmbH, Deutschland
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, England

2.1.6 Computerprogramme

Zur Planung von Klonierungen, Erstellung von Plasmidkarten und zur Ermittlung geeigneter Starteroligonukleotide für die PCR wurden die Programme *Gene Construction Kit v 2.5.13* (TEXTCO) und *oligo calculator* (http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/primer_calculation) verwendet. Die Detektion und Analyse radioaktiver Signale erfolgte mit Hilfe des Programms *Quantity One v 4.6.2* (BioRad). Die Auswertung der Quantitativen *real-time* RT-PCRs erfolgte mit Hilfe des Programms Sequence Detection Software Version 1.4. Zur Datenbankrecherche und Homologiesuche in öffentlichen Sequenzdatenbanken am National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurde der BLAST-Algorithmus (*Blast v 2.2.16*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) eingesetzt. Multiple Sequenzvergleiche erfolgten unter Verwendung des Programms *Multalin v 5.4.1* (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). Die Text- und Bildbearbeitung erfolgte mit gängigen Programmen der Firma Microsoft, Corel Draw und Adobe.

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht von Wildtyp-Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Ökotyp *Petit Havana*) erfolgte auf RM-Medium, von Wildtyp-Arabidopsis-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, Ökotyp *Columbia*) auf SEA-Medium.

Für die Anzucht transgener Tabakpflanzen wurde dem RM-Medium zur Selektion das Antibiotikum Spectinomycin (500 µg/ml) zugegeben.

Für die Chloroplasten-Transformation wurden sterile Tabakpflanzen (Ökotyp *Petit Havana*) in Magenta-Boxen aus oberflächensterilisierten Samen unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 25°C; 8 h Dunkelheit, 20°C) und bei einer Lichtintensität von ca. 50 µmol m⁻² s⁻¹ auf MS-Medium angezogen. Für die Plastiden-Transformation wurden junge Tabakblätter von 3 bis 4 Wochen alten Pflanzen (~15 cm hoch) eingesetzt. Die Regenerationszyklen nach der biolistischen Transformation erfolgten auf RMOP-Medium, das ebenfalls mit Spectinomycin versetzt wurde. Für die Doppelresistenz-Kontrolle wurden die transgenen Pflanzen auf RMOP-Medium mit Zusatz von Spectinomycin (500 µg/ml) und Streptomycin (500 µg/ml) ausgesetzt.

Zur Aussaat von Planzensamen auf zuckerhaltigem Medium wurden die Samen zuvor für 5 min mit 70% Ethanol, für 15 min mit 5%iger Natriumhypochlorid /1% SDS-Lösung und 5x für 1 min mit Reinstwasser gewaschen.

MS-Medium:	0,44% (w/v) MS Basalmedium; 3% (w/v) Saccharose (optional) in <i>A. bidest.</i> ; pH 5,8 mit 2 M KOH
RM-Medium+Agar:	0,42% (w/v) MS Basalmedium; 3% (w/v) Saccharose (optional); 0,3% (w/v) Agar für Pflanzenzellkulturen in <i>A. bidest.</i> , pH 5,6- 5,8 mit 2 M KOH
SEA-Medium+Agar:	0,44% (w/v) MS Basalmedium; 0,05% (w/v) MES in <i>A. bidest.</i> , pH 5,7 mit 2 M KOH
RMOP-Medium+Agar:	0,42% (w/v) MS Basalmedium; 3% (w/v) Saccharose; 0,01% Myo-Inositol; 0,1% Thiamin-HCl (1 mg/ml); 0,01% (v/v) NAA (1 mg/ml); 0,1% BA (1 mg/ml); 0,3% (w/v) Agar für Pflanzenzellkulturen in <i>A. bidest.</i> , pH 5,8 mit 2 M KOH

2.2.2 Anzucht von *Escherichia coli*-Kulturen

Die Vervielfältigung rekombinanter Plasmide erfolgte in *E. coli* Top10 (Invitrogen). Die Zellen wurden der plasmidkodierte Resistenz entsprechend in LB-(Agar)-Selektionsmedium unter Standardbedingungen angezogen (Sambrook und Russell, 2001).

LB-Medium	1% (w/v) Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LB-Agar	LB-Medium, 2% Agar

2.2.3 Phytohormonbehandlung mit 6-Benzyladenin (BA)

Seneszenten Tabak

Nicotiana tabacum Samen (Ökotyp *Petit Havana*) wurden auf Erde im 16h/8h Licht/Dunkelzyklus bei 25°C angezogen. Nach 12 Wochen wurden je zwei benachbarte Blätter am untersten Ende der Pflanze abgeschnitten und auf feuchtem Filterpapier in Wasser und konstanter Belichtung von 270 µmol m⁻² s⁻¹ einer Halogenlampe (Lamp Master HPI-T Plus 400W E40, Philips) für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Blätter in Wasser transferiert oder mit BA (Endkonzentration 5 µM) für weitere 15, 30, 60, 120 und 180 min im Starklicht (270 µmol m⁻² s⁻¹) behandelt. Transgene, cytokinindefiziente *Nta:AtCKX2* Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, Ökotyp *Samsun NN*) wurden auf die gleiche Weise angezogen und mit BA behandelt.

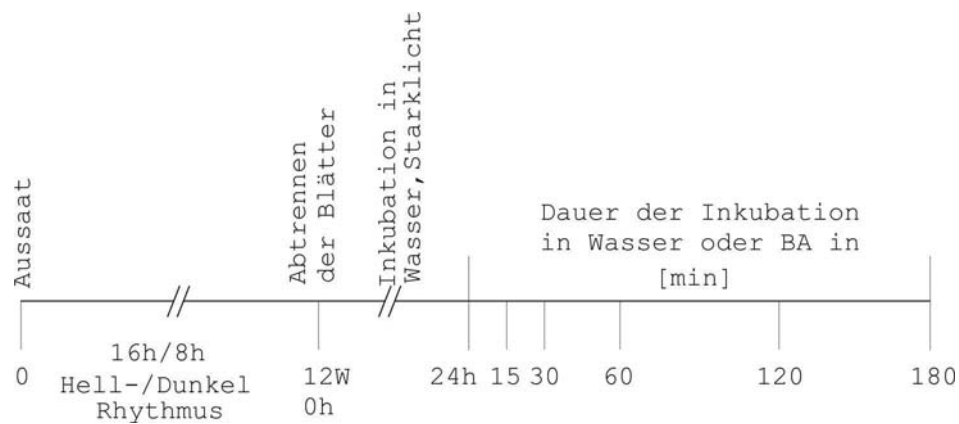


Abbildung 2.1: Skizze der experimentellen Strategie für die seneszenten Tabakpflanzen. Nach 12 Wochen (W) der Samenaussaat wurden die Tabakblätter abgetrennt und 24 Stunden (h) in Wasser unter konstantem Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) prä-inkubiert. Danach wurde die Inkubation der Blätter in Wasser oder BA-Lösung für 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten (min) unter konstantem Starklicht weitergeführt.

Sieben-Tage-alte Pflanzen

Die Behandlung von Sieben-Tage alten Arabidopsis- und Tabakpflanzen mit BA erfolgte nach Brenner et al. (2005). Arabidopsis- und Tabaksamen vom Wildtyp (Ökotyp *Columbia* bzw. Ökotyp *Petit Havana*) wurden in flüssigem $\frac{1}{2}$ MS Medium in Petrischalen einen Tag bei 4°C inkubiert, abgedichtet mit einer Frischhaltefolie. Die Petrischalen wurden dann in die Anzuchtskammer transferiert (24°C , Licht/Dunkel-Rhythmus von 16h/8h). Die Lichtintensität war $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Tabaksamen wuchsen sieben Tage bis zum Stadium 1.00, bei dem die Kotyledonen vollständig geöffnet waren (Boyces et al., 2001). Die BA-Lösung wurde mit einer Endkonzentration von $5 \mu\text{M}$ BA in $1,13 \text{ mM}$ KCl direkt zu der Pflanzenkultur gegeben, 5 h nach Beginn der Lichtexposition. Die Behandlung mit BA erfolgte für 15, 30, 60, 120 und 180 min. Kontrollpflanzen wurden parallel in $1,13 \text{ mM}$ KCl in flüssigem MS inkubiert. Das Ernten der Pflanzen erfolgte durch vollständiges Abziehen der Flüssigkeit. Das Pflanzenmaterial wurde für die RNA-Isolation (Kapitel 2.2.4.1.3) sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert bzw. direkt für die Chloroplastenisolation verwendet (Kapitel 2.2.9). Transgene, cytokinindefiziente Arabidopsis-Pflanzen (*Ath:CKX2*) wurden auf die gleiche Weise angezogen, aber nur 15 min mit BA behandelt.

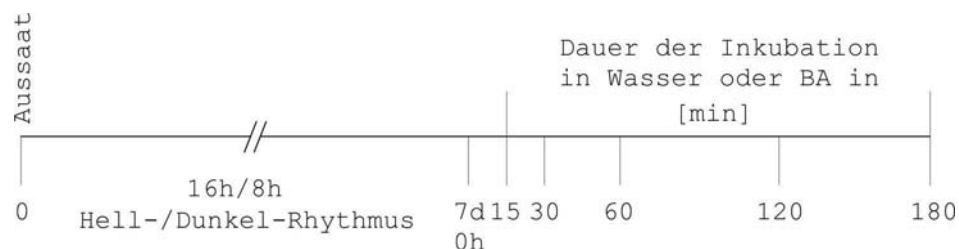


Abbildung 2.2: Skizze für die experimentelle Strategie für junge Pflanzen. Nach sieben Tagen (d) der Samenaussaat wurden die Pflanzen in Wasser oder BA-Lösung für 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten (min) unter normalen Lichtbedingungen inkubiert.

2.2.4 Nukleinsäuren

2.2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.4.1.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Nicotiana*

Die Isolation von Gesamt-DNA aus Tabak-Blattmaterial erfolgte mit Hilfe der CTAB-Methode (Murray und Thompson, 1980).

2.2.4.1.2 *Plasmidisolierung aus E. coli*

Kleinpräparationen von Plasmid-DNA wurden durch alkalische Lyse der Bakterien gemäß dem bei Sambrook und Russel (2001) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Großpräparationen erfolgten unter Zuhilfenahme des *Plasmid Midi Kits* bzw. *Plasmid Maxi Kits* (QIAGEN) nach Anweisung des Herstellers.

2.2.4.1.3 *Isolierung von Gesamt-RNA aus Nicotiana, Arabidopsis sowie transplastomen Pflanzenlinien*

Gesamt-RNA aus Tabak und Arabidopsis-Wildtyp-Blattmaterial wurden wahlweise mittels Trizol oder *RNA Plant Reagent* (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert, aus den transplastomen Pflanzenlinien ausschließlich mittels *RNA Plant Reagent*. Das erhaltene RNA-Sediment wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und in Reinstwasser resuspendiert. Die Gesamt-RNA wurde weiter aufgereinigt mittels *RNeasy mini-columns* nach Herstellervorgaben (QIAGEN). Die Quantifizierung erfolgte mit dem NanoDrop® Spektralphotometer (Kapitel 2.2.4.1.4), die Qualitätskontrolle mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.4.2).

2.2.4.1.4 *Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen*

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen erfolgte über die Messung der Absorption bei 260 nm mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (PeqLab). Für die Messung wurde ein absolutes Volumen von 1 µl eingesetzt. Neben der Bestimmung der Konzentration ermittelt der NanoDrop® Spektralphotometer die Qualität der Nukleinsäure. Das Absorptionsverhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte für eine saubere, von Proteinen gereinigte Nukleinsäurepräparation im Bereich von 1,8 bis 2,0 liegen.

2.2.4.2 *Natriumacetat-/Ethanolfällung von DNA und RNA*

Die zu fällenden DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit 1/10 Vol Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol 96% Ethanol sowie 1 µl Glykogen vermischt und 40 min bei -80°C gefällt. Danach wurden sie für 40 min bei 16000xg und 4° C zentrifugiert, um die Nukleinsäure zu sedimentieren. Das Sediment wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem angemessenen Volumen in Reinstwasser resuspendiert.

2.2.4.3 *Enzymatische Restriktion von DNA*

Spaltungen von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgten in 20 µl-Ansätzen in vom Hersteller empfohlenen Puffer. Pro Reaktionsansatz wurde für den Verdau von ~1 µg DNA 5 U einer Restriktionsendonuklease verwendet. Die Ansätze wurden bei 37°C für 1- 2 h inkubiert.

Für einen Doppelverdau wurden jeweils 10 U der gewählten Restriktionsenzyme zu dem Ansatz zugefügt. Abweichende Einsatzmengen der Restriktionsendonukleasen und das zu verwendende Puffersystem wurden auf folgender Internetseite berechnet: <http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>.

Der enzymatische Verdau von DNA für die *Southern Blot*-Analyse wurde in 120 µl Ansätzen durchgeführt, in denen 5 µg DNA mit 6 U *Bgl*II-Restriktionsenzym (Fermentas) sowie entsprechenden Puffersystem vermischt und mit *A. bidest.* aufgefüllt wurden. Diese Ansätze wurden bei 37°C für mindestens 8 h inkubiert und anschließend präzipitiert (Kapitel 2.2.4.2). Das Sediment wurde in 30 µl *A. bidest.* resuspendiert.

2.2.4.4 Elektrophorese von Nukleinsäuren

2.2.4.4.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur analytischen und präparativen Auftrennung wurden die DNA-Proben mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und auf 0,8-1,5%igen Agarosegelen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Zur effektiven Analyse von 5'-RACE-Produkten wurden Gele mit 1% Agarose (Biozym) und 3% Nusieve-Agarose (Biozym) verwendet. Parallel zu den Proben wurde ein 50 bp-, 100 bp- bzw. 1 kb-DNA-Molekulargewichtsmarker (Fermentas) aufgetragen. Die DNA wurde bei einer Spannung von 5-10 V/cm in einer horizontalen Elektrophoresekammer (*PerfectBlue Gelsystem Mini S* oder *Mini M*, Peqlab) in 1x TAE-Laufpuffer aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch UV-Transillumination (*Gel Doc XR System*, BioRad) visualisiert.

DNA Moleküle aus präparativen Agarosegelen wurden ausgeschnitten und mittels *QIAquick spin columns* (QIAGEN) gereinigt.

Für die *Southern Blot*-Analyse wurde die verdaut DNA mit 1/10 Volumen Ladepuffer versetzt und ü.N. bei 4°C und 40 V in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

1x TAE:	40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA
DNA Ladepuffer:	50% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,005% (w/v) Bromphenolblau; 0,005% (w/v) Xylencyanol

2.2.4.4.2 Agarosegelelektrophorese von RNA

Zur Qualitätskontrolle wurde jeweils 1 µg präparierte RNA (Kapitel 2.2.4.1.3) auf 1%igen Agarosegelen analysiert. Hierzu wurde 1% (w/v) Agarose (Biozym) in 1x MEN geschmolzen und nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60°C 1/40 des endgültigen Gelvolumens Formaldehyd zugegeben. Die RNAs wurden mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt und vor der Beladung des Gels für 5 min bei 65°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in 1x MEN-Laufpuffer bei 8 V/cm in einer horizontalen Elektrophoresekammer (*PerfectBlue Gelsystem Mini S*, Peqlab) durchgeführt. Aufgetrennte RNA-Moleküle wurden durch UV-Transillumination (*Gel Doc XR System*, BioRad) visualisiert.

1x MEN:	20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA
2x RNA Ladepuffer:	50% (v/v) Formamid; 17,5% (v/v) Formaldehyd; 20% Glycerin, 1,25 mM EDTA pH 8,0; 1,27 mM Ethidiumbromid; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 0,2% (w/v) Xylencyanol; in 1x MEN

2.2.4.4.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von cDNA

Die Auftrennung der *Primer Extension*-Produkte (Kapitel 2.2.8) erfolgte in 5%igen denaturierenden Polyacrylamidgelen mit Hilfe einer Sequenzgelelektrophorese Kammer (*Model S2 Sequenzgel Elektrophorese Apparatur*, Biometra GmbH). Nach einem 10-minütigen Gel-Vorlauf wurden die in Formamidladepuffer gelösten, denaturierten Proben (85°C/ 5 min) in 0,6x TBE-Laufpuffer bei einer konstanten Leistung von 55 W für ca. eineinhalb Stunden aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend auf Whatman 3MM Papier transferiert und mit Klarsichtfolie auf einem *Model 583 Geltrackner* (BioRad) unter Vakuum getrocknet. Nach 12stündiger Exposition auf *K-Type Imaging Screen* bei RT erfolgte die Visualisierung und Auswertung mittels Autoradiographie in einem Phosphorimager (*Molecular Imager FX*, BioRad) sowie Computersoftware Quantity One (BioRad).

10x TBE:	500 mM Tris; 500 mM Borsäure; 10 mM EDTA
Gelzusammensetzung:	7 M Harnstoff; 4% Acrylamid (Gel 40, Roth) in 1,2x TBE
2x Formamidladepuffer	98% (v/v) deionisiertes Formamid; 2 mM EDTA; 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 0,02% (w/v) Xylencyanol

2.2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen aus genomischer oder Plasmid-DNA wurde *Taq*-DNA-Polymerase (QIAGEN) im mitgelieferten Puffer sowie 200 µM dNTPs und jeweils 10 pmol Starteroligonukleotide in einem 50 µl-Reaktionsansatz nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Die angebotene DNA-Menge variierte zwischen 1 ng (Plasmid-DNA) und 100 ng (genomische DNA). Nach einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C wurden 30-35 Zyklen durchgeführt, wobei die Denaturierung bei 94°C/30 s, die Bindung bei 50-65°C/30 s und die Synthese bei 72°C/1 min /kb erfolgte. Um das Vorhandensein evtl. unvollständiger Amplifikationsprodukte zu minimieren, schloss sich ein weiterer Elongationsschritt bei 72°C für 10 min an. Die PCR wurde in einem *Peltier Thermal Cycler PTC-200* (Biozym) durchgeführt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.4.1).

2.2.4.6 Klonierung

Standardmethoden zur DNA-Manipulation wie Restriktionsspaltungen, Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mittels Alkalischer Phosphatase und Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-DNA-Ligase erfolgten nach den bei (Sambrook und Russell, 2001) beschriebenen Methoden. Restriktasen, Alkalische Phosphatase und T4 DNA-Ligase wurden von der Firma Fermentas bezogen. Zur direkten Klonierung von PCR-Produkten in den pDrive-Vektor kam der *PCR Cloning kit* (QIAGEN) nach Anweisung des Herstellers zum Einsatz.

2.2.4.7 Transformation von *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* TOP 10 Zellen mit Ligationsprodukten oder Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook und Russell (2001). Die anschließende Selektion transformierter Zellen erfolgte auf LB-Agar-Platten, mit dem der plasmidkodierte Resistenz entsprechenden Antibiotikum. Gegebenenfalls wurde zur Selektion von TOP10-Zellen den LB-Agar-Platten X-Gal (40 µg/ml) für eine Blau-Weiß-Selektion zugesetzt.

2.2.4.8 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA wurde der ABI PRISM™ *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 300-400 ng Plasmid-DNA bzw. 15-40 ng PCR-Produkt und 10 pmol des entsprechenden Starteroligonukleotids (Tabelle 2.3). Die Sequenzreaktion, die Produktaufreinigung und -analyse mittels eines automatischen ABI 3130XL DNA-Sequenzierers wurden von Dr. Martin Meixner (DLMBC, Rüdersdorf) durchgeführt.

Nachfolgend aufgelistete Oligonukleotide wurden in die Sequenzierung eingesetzt:

Tabelle 2.3: Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Zielsequenz
M13-seq-Fw M13-seq-Rev	ACGACGTTGTAAAACGACGG TTCACACAGGAAACAGCTATGAC	pDrive
5' <i>PrpoB</i> -345-seq 3' <i>PrpoB</i> -345-seq	GGAAAGAAATTGATAAAACATCCCT AACAATAAAGAGAAGAAAGACGGATA	<i>PrpoB</i> (wt)-345 ₈ (CAT) ₆ ¹ , <i>PrpoB</i> -345 ₈ (CAC) ₆ ¹ , <i>PrpoB</i> -345 ₈ (CAT) ₆ ¹
5' <i>rpoB</i> PE1 3' <i>rpoB</i> PE1	AAATTGTTTGTCTTGCATATCCC AGCGAAAAGATCAAATGTGCAAT	<i>PrpoB</i> (wt)-345 ₈ (CAT) ₆ ¹
5' <i>rpoB</i> PE2 3' <i>rpoB</i> PE2	AAAGAAATTGATAAAACATCCCTAGAA CCCAAGAGAAATTGTTAGACGGTA	<i>PrpoB</i> (wt)-345 ₈ (CAT) ₆ ¹ , <i>PrpoB</i> (mC)-345 ₈ (CAC) ₆ ¹ , <i>PrpoB</i> (mE)-345 ₈ (CAT) ₆ ¹
5' <i>rpoB</i> PE3 3' <i>rpoB</i> PE3	AAAGAAATTGATAAAACATCCCTAGAA CGAAGTTTCCAAAAGGTCGT	<i>PrpoB</i> (mC)-345 ₈ (CAC) ₆ ¹ , <i>PrpoB</i> (mE)-345 ₈ (CAT) ₆ ¹
5' <i>rpoB</i> PE4 3' <i>rpoB</i> PE4	CCCAAGAGAAATTGTTAGACGGTA GCCGAAGTATCAACTCAACTATCAG	<i>PrpoB</i> (mC)-345 ₈ (CAC) ₆ ¹ , <i>PrpoB</i> (mE)-345 ₈ (CAT) ₆ ¹

2.2.4.9 5'-RACE Analyse von *in vivo* synthetisierten RNA-Transkripten

Die Bestimmung von 5'-Enden *in vivo* synthetisierter plastidärer Transkripte von Tabak-Pflanzen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Bensing et al. (1996). Es wurde eine 5'-RACE-Technik mit einer TAP- (*tobacco acid pyrophosphatase*) Behandlung kombiniert (beschrieben in Kühn et al., 2005). Zunächst wurden die 5'-Triphosphate primärer RNA-Transkripte durch Behandlung von 2 µg RNA mit 10 U TAP (Epicentre Biotechnologies) für 1 h bei 37°C in Anwesenheit von 40 U RNase-Inhibitor (Fermentas) in Monophosphate umgewandelt (+TAP). Als Kontrollen fungierten identische Ansätze ohne TAP (-TAP). Die RNA wurde anschließend einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1) unterzogen, aus der wässrigen Phase durch die Zugabe von 100% Ethanol/3 M Natriumacetat pH 5,2 (30:1) gefällt und in Reinstwasser gelöst. Es folgte die Ligation eines RNA-Linkers (5'-GUGAUCCAACCGACGCGACAA GCUA AUGCAAGANN-3') an die 5'-Enden der Transkripte. Hierzu wurde die RNA für 1 h bei 37°C in Anwesenheit von 10 pmol des 5'-RNA-Linkers, 50 U T4 RNA Ligase (Epicentre Biotechnologies), 1 mM ATP und 80 U RNase-Inhibitor (Fermentas) im entsprechenden Puffer inkubiert. Kontrollreaktionen wurden ohne den RNA-Linker angesetzt. Nachfolgend wurde die RNA wie oben beschrieben einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion und Ethanolpräzipitation unterworfen. Die RNA wurde in H₂O gelöst und unter Verwendung des *Superscript III RT kits* (Invitrogen) und der *rpoB*-spezifischen Oligonukleotide (siehe Tabelle 2.4) nach Angaben des Herstellers für 1 h bei 55°C revers transkribiert. Die Produkte der reversen Transkription (RT) wurden in einer ersten PCR mit 35 Zyklen mit einem Linker-spezifischen Oligonukleotid (5'-TGATCCAACCGACGCGAC-3') und den entsprechenden genspezifischen reversen Oligonukleotiden amplifiziert. In den 50 µl-PCR-Ansatz wurden 1/10 Vol der RT-Reaktion, jeweils 10 pmol Primer, 200 µM dNTPs und 0,5 U *Taq* DNA-Polymerase (QIAGEN) im entsprechenden Puffer eingesetzt. Die Amplifikation beinhaltete einen initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 min gefolgt von 35 Zyklen von 95°C für 30 s, 56°C für 30 s, 72°C für 2 min und einem finalen Elongationsschritt bei 72°C für 5 min. In eine zweite PCR wurden 2/50 µl der ersten PCR als *template* eingesetzt, die prinzipiell wie die erste durchgeführt wurde. Das Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-ACCGACGCGACAAGCTAATGC-3' wurde als *nested* Vorwärts-Primer verwendet. Die Zyklusbedingungen waren: 94°C/3 min; 35 Zyklen 95°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C/1 min; 72°C/5 min. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.2.4.4.1) analysiert, aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den pDrive-Vektor (QIAGEN) ligiert (Kapitel 2.2.4.6). Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* transformiert (Kapitel 2.2.4.7), Plasmid-tragende Bakterienklone durch Blau-Weiss-Selektion und die erhaltene Antibiotikaresistenz identifiziert und der Firma DLMBC zur *in vitro*-Replikation und Sequenzierung mit M13-seq-Rev Primern übergeben (Kapitel 2.2.4.8).

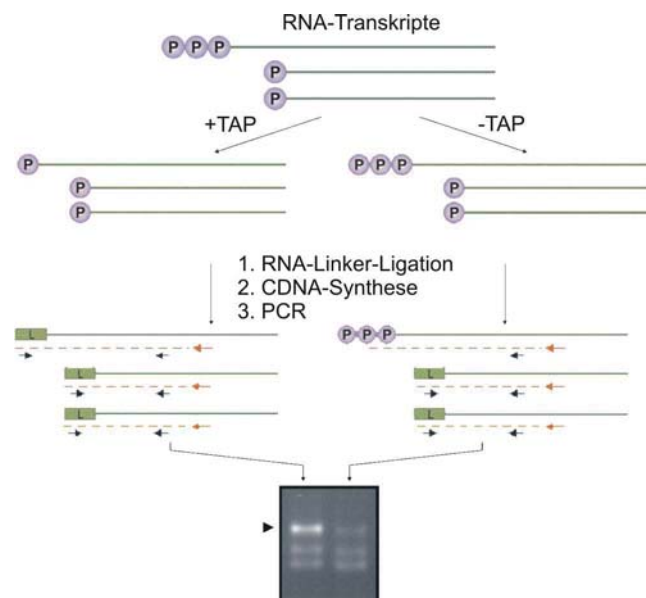


Abbildung 2.3: 5'-RACE-Technik zur Unterscheidung primärer von prozessierten 5'-Transkriptenden.

Transkripte werden mit TAP behandelt, um 5'-Triphosphate in Monophosphate umzuwandeln (links). TAP-unbehandelte Transkripte dienen als Negativkontrolle (rechts). Ein RNA-Linker (grüne Box) ligiert anschließend an die Monophosphatenden. In einer sich daran anschließenden cDNA-Synthese werden die Ligationsprodukte unter Verwendung eines komplementären, Gen-spezifischen Primers (Pfeile in Orange) revers transkribiert (gestrichelte Linien in Orange). Revers-transkribierte Ligationsprodukte werden unter Verwendung eines Linker-spezifischen Vorwärts-Primers sowie eines Gen-spezifischen *nested* Rückwärts-Primers (kleine schwarze Pfeile) amplifiziert und RT-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Produkte von primären Transkripten (Bande angezeigt mit einem Dreieck) werden über den Vergleich von TAP-behandelten und TAP-unbehandelten Proben identifiziert (siehe Text). Entnommen und modifiziert von Kühn (2006). Nach Bensing et al. (1996).

Tabelle 2.4: Zur 5'-RACE-Analyse verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Verwendung	Detektierte Startstelle
PEN $trpoB$ -106	CCGAATCACATGAAATTTTACCCAAC	RT	
PEN $trpoB$ -156	CGTATGAACGGAGGAAGAAAGAGAA	1.PCR	
PEN $trpoB$ -210	TGGAATTTTCAACAGATACAAATGG	2.PCR	$PrpoB$ -344/3 $PrpoB$ -292/-288
PEN $trpoB$ -352	TGATAATACACATTCCAACCTGCTT	RT	
PEN $trpoB$ -398	TTCGACATTGATCTTTTCGCT	1.PCR	
PEN $trpoB$ -484	CCCCTTTTCTGTTATGGATTTCGT	2.PCR	$PrpoB$ -618 $PrpoB$ -558 Position -656/644
PEN $trpoB$ -484	CCCCTTTTCTGTTATGGATTTCGT	RT/1.PCR	
PEN $trpoB$ -662	ATTGTCGTTCTCTGTTCTATTTCGGG	2.PCR	Position -821 Position -753 Position -735

2.2.4.10 Quantitative *real-time* RT-PCR

Aus der isolierten Gesamt-RNA (1 µg) wurde mit Hilfe von *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (QIAGEN) nach Herstellerangaben cDNA hergestellt. Diese wurde als *template* für die quantitative RT-PCR eingesetzt. Die quantitative PCR wurde in einem 7500 Real-Time PCR System durchgeführt (Applied Biosystems). Jeder 15 µl-Ansatz enthielt 1x qPCR Mastermix™ Plus – Low ROX (Eurogentec, Belgien), 110 nM genspezifische Sonde (Universal Probe Library, Roche Applied Science, USA), 1,1 mM genspezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Tabelle 2.5) sowie verschiedene Mengen an cDNA als *template* (100 ng: *RpoTp*, *RpoTmp*, *RpoTm*, *UBQ*; 50 ng: *psbA*, *rbcL*, *rrn16*, *rpoB*). Jeder Ansatz wurde als Triplett auf eine 96-Microwell-Platte (Applied Biosystems) aufgetragen. Die Wahl der Primerpaare führte zu Amplifikationsprodukten zwischen 90 bis 110 Basenpaaren. Das PCR-Programm startete mit einem ersten Aktivierungsschritt für die Polymerase (10 min, 95°C) gefolgt von 40 Zyklen mit je einem Denaturierungsschritt (95°C, 15 s) und einem Annealings-/Elongationsschritt (60°C, 1 min), bei dem auch die Fluoreszenz der angelagerten Sonden gemessen wurde. Für die Detektion von GUS- und GFP-mRNA-Mengen wurde das *SYBR Green* PCR-Reaktionsgemisch verwendet (Applied Biosystems). Entsprechend 100 ng revers transkribierte Gesamt-RNA wurde eingesetzt. Nach dem letzten Zyklus wurden die PCR-Produkte einer Hitzedenaturierung mit einem Temperaturgradienten von 60°C bis 95°C bei 0,03°C/s ausgesetzt, um die Abwesenheit von nicht-spezifischen Amplifikationsprodukten zu testen. Alle Quantifizierungen wurde auf die Menge an Transkripten von UBQ als internen Standard mit Hilfe der ΔC_T Methode ($2^{-\Delta C_T}$ [$\Delta C_T = C_T \text{ Testgen} - C_T \text{ endogene Referenz}$]) normalisiert. Zwei bis drei unterschiedliche cDNA-Präparationen wurden für jedes Gen analysiert, um die Qualität der Gesamt-RNA sowie die Konversionseffizienz der reversen Transkriptionsreaktion zu testen. Alle quantitativen *real-time* RT-PCRs wurden in Duplikaten durchgeführt, indem zwei unterschiedliche Verdünnungen von zwei unabhängigen Sets an cDNA-Synthesen verwendet wurden. Wiederholt wurde dies je mit zwei Sets von unabhängigen RNA-Präparationen. *Non-template* Kontrollreaktionen wurden für jedes Primerpaar durchgeführt. Negativkontrollen (ohne Reverse Transkriptase) wurden in allen Proben mitgeführt, um die vollständige Entfernung von DNA zu verifizieren. Die Daten wurden mit Hilfe der 7500 *System SDS software* ausgewertet (Version 1.3, Applied Biosystems) und als normalisiertes Reportersignal (Rn) aufgetragen. Rn repräsentiert die Fluoreszenzmenge während der PCR nach Subtraktion des Hintergrundrauschens gegen die Zyklusanzahl. Ein Schwellenwert wurde auf 0,8 im oberen Drittel der linearen Phase der Amplifikationskurve gesetzt. Der C_T -Wert (*threshold cycle*) gibt die Zykluszahl an, bei der die Menge des PCR-Produkts, d.h., die Reporterfluoreszenz den Schwellenwert erreicht hat.

Tabelle 2.5: Oligonukleotide eingesetzt für quantitative *real-time* RT-PCR

Name	Sequenz (5'→3')	5' Position	Probe Library #
5'At <i>RpoTp</i>	TTGCAGAAGTGAAAGACATCTGA	Chromosom II	21
3'At <i>RpoTp</i>	ATCGACCGTGTACCCCTCTC		
5'At <i>RpoTmp</i>	CGATGCCATTGAACAAGAGAT	Chromosom V	91
3'At <i>RpoTmp</i>	TGTTCCCTTCATAGAAGTTTCATTTTC		
5'At <i>RpoTm</i>	ACAGAAATTGCGGCTAGGG	Chromosom I	6
3'At <i>RpoTm</i>	GGCATATGTGGCATTGGA		
5'AtUBQ	CTTATCTTCGCCGAAAGC	Chromosom IV	88
3'AtUBQ	GAGGGTGGATTCTTCTGG		
5'At <i>rbcL</i> 3'At <i>rbcL</i>	TCATATTCACGCGGTACAG TCAACAAAGCCCAAAGTTGAC	55929 55997	94
5'At <i>psbA</i> 3'At <i>psbA</i>	CTGCTAATGAAGGTTACAGATTTCG ACCGTGAGCAGCTACAATGTT	750 686	143
5'At <i>rrn16</i> 3'At <i>rrn16</i>	TGAACAGACTGCCGGTGATA AAGGGGCATGATGACTTGAC	102109 102171	69
5'At <i>rpoB</i> 3'At <i>rpoB</i>	TCTCGGTCCGAAAAGTGC CGGGAACCCCTGAATCTAA	24658 24607	154
5'AtPEND 5'AtPEND	ACCAATCATATTTCTGTCCCTATG CAACATCTACTGAAGCAGAATTTACAA	Chromosom III	141

5'ARR4 3'ARR4	CCGTCACCTCCGTTGACTAT CGACGATTTCAGTCGAAACAG	Chromosom I	55
5'NtRpoTm 3'NtRpoTm	GGGGTTGGGAAGTACAATTTTC CCACGCTTCGGTTTCTACTT	Chromosom IV	133
5'NtRpoTmp 3'NtRpoTmp	TTCTGCTGACAAACCACTTGA TGAAAGGGATCCTCTGCATT	Chromosom IV	131
5'NtRpoTp 3'NtRpoTp	CTAAATGGAAATCGATGGTGGT GCAAGCTGCTAAGCACTGAA	Chromosom IV	73
5'NtUBQ 3'NtUBQ	GGACCAGCAGAGGTTGATCT TCAGCCAAGGTCCTTCCAT	Chromosom IV	38
5'NtrpoB 3'NtrpoB	CGATCATTGGGGGAACAATA CGAACGAGCAATCGAAAAG	24444 24381	50
5'Ntpsba 3'Ntpsba	ACCTTGGAATTGCTGTGCAT ATCAAGAAAACCTGCGGTAGCA	1176 1117	17
5'NtrbcL 3'NtrbcL	CCACTTCCGGGTATTAGCAA CCTACTACGGTACCAGAGTGAATATG	58521 58592	22
5'Ntrrn16 3'Ntrrn16	AAATCCCAGGGCTCAACC GAAATTCCCTCTGCCCTAC	103314/139312 103387/139239	78
5'GFP_qPCR 3'GFP_qPCR	CATGCCTGAGGGATACGTG TTGTAGTTCCCGTCGTCCTT	-	-
5'GUS_qPCR 3'GUS_qPCR	CTGATAGCGCGTGACAAAAA CGGTTTCGTTGGCAATACTC	-	-

2.2.4.11 Blotten von Chloroplastengen

Fragmente von 20-22 plastidären Genen wurden mittels PCR amplifiziert, in den pDrive-Vektor (QIAGEN) kloniert und mit den M13-seq-Primern sequenziert (siehe Kapitel 2.2.4.5 – Kapitel 2.2.4.8). Die Oligonukleotide für die Amplifikation spezifischer Genregionen sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen. Mit Hilfe einer *96-well Bio-Dot* Mikrofiltrationsapparatur (BioRad) und UV-Vernetzung wurden 1 µg DNA von jedem amplifizierten Genfragment auf einer Nylon Hybond-N⁺ Membran (Amersham Pharmacia Biotech, England) fixiert. Für die Regeneration der Membran siehe Kapitel 2.2.10.

Tabelle 2.6: Für die Amplifikation spezifischer Genregionen verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'→3')	5' Position im ptDNA ²
5' AtpetB 3' AtpetB	TAGTAAATATGTTCTCCGCATGTC GACGCCCGTAAGAAGAGGTAAT	75710 76235
5' AtpsaB 3' AtpsaB	CGGGTCATATGTATAGAACGAACTTTG CAAGCCGAAATATCACAAGTACCAC	38234 39092
5' Atpsba 3' Atpsba	ACTTCTGTTTTTATTATCGCATTTCATTG TCCATACCAAGGTTAGCACGG	515 1368
5' AtrbcL 3' AtrbcL	CAACTGTGTGGACCGATGG CCTACTACTGTACCCGCGTGAA	55157 55955
5' AtaccD 3' AtaccD	ATGGTTGGGATGAGCGTTCT AAGTACCCGGATCAATCGAAA	57223 57885
5' AtatpB 3' AtatpB	AGGTCCTGTGCGATACTCGCA ATCTAAAGGATCTACCGCTGGATA	53022 53766

5' <i>AtpetD</i> 3' <i>AtpetD</i>	TAGCTAAAGGTATGGGTCACAATTATTAC AATCAAAAAGACGGTTGTCGC	77242 77594
5' <i>Atrps8</i> 3' <i>Atrps8</i>	GATCGACTAACATCACGAAAGTATTG TCTCGTCTGTCAATTATACCTTGA	80147 80423
5' <i>Atrps4</i> 3' <i>Atrps4</i>	ATCTTAGAAAACCAATCACGCTCC AAACCGACGCATTTCTCTATCT	45314 45779
5' <i>Atrrn16</i> 3' <i>Atrrn16</i>	ATTGGGCGTAAAGCGTCTGTA GTAACGACTTCGGGCATGG	101522 102402
5' <i>AtatpF</i> 3' <i>AtatpF</i>	GATTCTTTCGTTTACTTGGGTCAC TTTAATATCCTCTGCTTTCGGTTATC	11544 12428
5' <i>AtatpH</i> 3' <i>AtatpH</i>	TTTCTGCTGCTTCGGTTATTG GCTAATGCTACAACCAGGCCATA	13275 13479
5' <i>Atpsbe</i> 3' <i>Atpsbe</i>	TTCATTGCGGGCTGGTTATT CAAAGGATCAAAACGGCCTGT	64161 64289
5' <i>AtrpoB</i> 3' <i>AtrpoB</i>	TATTATATGATAGCGGCAGGAAATT ATAGGAGGATTCTTTCGCCACT	24542 25372
5' <i>Atpsbg</i> 3' <i>Atpsbg</i>	GGTCAAGACTTTCAGCCTATG TCTCTGAAGTAGATGATGGTGATAGA	50016 50549
5' <i>NtatpB</i> 3' <i>NtatpB</i>	CGTCCAAATCATCGGTCCGGTACTA TGCGGGTACATAAACTGCTTGAATAGAGGT	56709 55785
5' <i>NtatpH</i> 3' <i>NtatpH</i>	AAAAGGATTCGCAAATAAAAGTGC GCTTCCGTTATTGCTGCTG	13860 14087
5' <i>NtatpF</i> 3' <i>NtatpF</i>	AGAAGAACTGCGTGGAGGGGCTATT GTAAGGCTTGTTGGAAAACCCGTTG	12557 12310
5' <i>NtndhB</i> 3' <i>NtndhB</i>	ATTTGTGTATTGATAAGACCGTTTACTATTT CCGATGGAGAGAAGAACCTATG	98594 99031
5' <i>NtndhF</i> 3' <i>NtndhF</i>	AAAGCGTTTGTAACATAATCGTGTAGGG ATTATTGCGAAAATTGGCGAATAC	112598 113370
5' <i>NtpsaA</i> 3' <i>NtpsaA</i>	GCGATTTCTTATGGGCACAGG CGGTTTCCATTTTCGGTTGTAGG	40604 41433
5' <i>NtpsaB</i> 3' <i>NtpsaB</i>	CGGGTCATATGTATAGAACGAACTTTG CAAGCCGAAATATCACAAGTACCAC	38234 39092
5' <i>NtpsaC</i> 3' <i>NtpsaC</i>	ATTAGAAATGATACCTTGGGATGGAT TGTTTCATGCCATAAAATAAACTCGAAC	117392 117536
5' <i>Ntpsba</i> 3' <i>Ntpsba</i>	ACTTGCGTAGCTTGTTACATGGGTC ACTGAATAGGGAGCCGCCGAATA	1236 960
5' <i>Ntpsbb</i> 3' <i>Ntpsbb</i>	CTAACGGGAAAAGTACAACCTGTAAATC CACCATCGGATTTCAAAGTAGCAC	75472 76276
5' <i>Ntpsbe</i> 3' <i>Ntpsbe</i>	CGGCTCTCTGTAAATACTCGTT CGTTCGTTTGCTGATATTATTACCA	66951 67108
5' <i>NtaccD</i> 3' <i>NtaccD</i>	AATAAATCAATGGGCAGTCTTGGTCCTA GGCCCTATAAATGTAACTGTACCGTAATTC	59907 60389
5' <i>Ntrrn16</i> 3' <i>Ntrrn16</i>	AATGATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAGG CAAACCTAACGATGGCACTAAACACGA	103266/139360 103850/138776
5' <i>NtrbcL</i> 3' <i>NtrbcL</i>	GCTGCCGAATCTTCTACTGGTACATGGA CGCAGTAAATCAACAAAGCCCAAAGTTATG	57766 58643
5' <i>Ntrps4</i> 3' <i>Ntrps4</i>	TATATTGGAATGGGTGAAGGGTC ATTGCGTTTTTCATTATGGTCTTACA	47628 47983

5' <i>Ntrps8</i> 3' <i>Ntrps8</i>	TGGGTAGGGACACTATTGCTGAGATAAT GGTCTTTTCCTATTCCCTCTATGTCGC	83005 82792
5' <i>Ntrpl23</i> 3' <i>Ntrpl23</i>	GTCCCATAAATAGGTCCCATTCTTC GGGAAAATCAATATACTTCTAATGTCG	88332 88482
5' <i>NtpetB</i> 3' <i>NtpetB</i>	TCGGCAAGTATGATGGTCCTAA TGCATTAACATAAATACGGCAGTAAGA	78469 78809
5' <i>NtpetD</i> 3' <i>NtpetD</i>	AGAGCTAAATTGGCTAAAGGTATGGGTCA AAGTTAGGGATTTATCAATAGGTAATGTTGCAC	79827 80253
5' <i>NtrpoB</i> 3' <i>NtrpoB</i>	GCTGCTTGTCGTTCCAACC GGATTGGCTCTGGTTCGTTTAG	25797 26536

²Nt ptDNA: EMBL-Datenbankeintrag unter *Accession*-Nr. NC_001879), At ptDNA: EMBL-Datenbankeintrag unter *Accession*-Nr. AP000423

2.2.5 Plastidentransformation zur Herstellung von Tabak-*rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten

2.2.5.1 Plasmid-Vorbereitung für die Plastid-Transformation

Ausgangspunkt war der Vektor pRB94, ein pBluescript-Derivat, der freundlicherweise von Prof. Dr. Ralph Bock (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm) zur Verfügung gestellt wurde (Abbildung 3.13). Er enthält das chimäre Resistenzgen *aadA* mit einem vorgeschalteten *rrn16*-Promotor, das direkt neben der multiplen Klonierungsstelle (MCS = *multiple cloning site*) integriert ist. Es kodiert für eine Aminoglykosid-3'-Adenyltransferase, ein Enzym, welches Spectinomycin und Streptomycin durch Adenylierung inaktiviert, so dass dessen Expression Resistenz gegenüber diese Antibiotika verleiht. Die homologe Rekombination zwischen der plastidären *Targeting*-Sequenz des pRB94-Vektors und der *Target*-Sequenz des Plastidengenoms findet in der intergenischen *trnM-trnG*-Region statt.

Die Komponenten, die in pRB94 eingebaut wurden, waren (1) eine Terminorkassette *TrbcL* aus *Nicotiana tabacum*, (2) die Reportergene GUS bzw. GFP sowie (3) die *PrpoB*-Fragmente *PrpoB*_(-277/+339), *PrpoB*_(-28/+339), *PrpoB*_(-277/+6) und *PrpoB*_(-28/+6), die verschiedene Sequenzlängen stromaufwärts des Tabak-*rpoB*-Promotors umfassen (Tabelle 2.1). Die Terminorkassette *TrbcL* kodiert für die mRNA-3'-UTR (3'-UTR = 3'-*untranslated region*), dessen 3'-regulatorische Region für die mRNA-Stabilität wichtig ist. Die jeweiligen Sequenzabschnitte sind aus den Vektoren pBI121 (GUS), pMAV4 (GFP) und aus der Tabak-DNA mittels spezifischer Primer amplifiziert worden (Tabelle 2.1).

Als ersten Schritt für die Herstellung der plastidären Transformationsvektoren wurde *TrbcL* als *PstI/XhoI*-214bp-Fragment in pRB94 kloniert, aus dem pSH0 hervorging. Es folgte der Einbau der GUS- und GFP-Sequenzen über die Schnittstellen *BamHI/PstI* in pSH0, resultierend in pSH1 sowie pSH2. Der Basisvektor pSH4 wurden durch das Einbringen einer kurzen *leader*-Sequenz des Gens *rbcl* [*Lrbcl* (S)] in die *EagI/BamHI*-Schnittstelle von pSH2 gewonnen. Die *leader*-Sequenz unterstützt während der Translation die Bindung zwischen der 5'-16S rRNA und der mRNA, welches zu einer Erhöhung der Expression der Reportergene führt. Schließlich wurden die *PrpoB*-Sequenzen als *SacI/BamHI*- bzw. *SacI/EagI*-Fragmente mit den GUS- bzw. GFP-Genen in pSH1 bzw. pSH4 fusioniert. Die Oligonukleotide für die Amplifikation der spezifischen Genregionen sind der Tabelle 2.7 zu entnehmen. Die aus pSH1 gewonnenen *PrpoB*::GUS-Vektoren wurden als pSH6, pSH7 und die aus pSH4 abgeleiteten *PrpoB*::GFP-Vektoren als pSH15 und pSH16 (Tabelle 2.1) benannt. Die entsprechenden Pflanzen erhielten die Bezeichnungen NtSH-6, NtSH-7, NtSH-15 bzw. NtSH-16 (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.7: Oligonukleotide eingesetzt für die Herstellung der pSH-Konstrukte

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3') ³	5'-Nukleotidposition in ptDNA ²
5' Nt <i>TrbcL</i> <i>PstI</i> 3' Nt <i>TrbcL</i> <i>XhoI</i>	gggctgcagctctagAGTAGAACATTAGCAG gggctcgagCTAGATTTTGTATTTCAAATC	59033 59246

5' GUS <i>Bam</i> HI 3' GUS <i>Pst</i> II	gggggatccATGTTACGTCTGTAGAAAC gggctgcagTCATTGTTTGCCTCC	-
5' GFP <i>Bam</i> HI 3' GFP <i>Pst</i> II	gggggatccATGAGTAAAGGAGAAGAACTT gggctgcagTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC	-
5' <i>NtLrbcL</i> (S) <i>Eag</i> I/ <i>Bam</i> HI	gggcggccgAGTTGTAGGGAGGGATccggg	57577
3' <i>NtLrbcL</i> (S) <i>Eag</i> I/ <i>Bam</i> HI	cccggATCCCTCCCTACAACtcggccgccc	57592
5' <i>NtrpoB</i> (-277) <i>Sac</i> I	ggggagCTCCACACGTGGTTAAGC	28133
5' <i>NtrpoB</i> (-28) <i>Sac</i> I	ggggagctCAGGTTGGAATGTGTATTATC	27884
3' <i>NtrpoB</i> (+339) <i>Eag</i> I	gggcggccgTTTCCCATTTATCAAAAA	27518
3' <i>NtrpoB</i> (+339) <i>Bam</i> HI	gggggatccTTTCCCATTTATCAAAAA	27518
3' <i>NtrpoB</i> (+6) <i>Bam</i> HI	gggggatccCTACCATTATTATGATAATAC	27851
3' <i>NtrpoB</i> (+6) <i>Eag</i> I	gggcggccgCTACCATTATTATGATAATAC	27581

³Kleinbuchstabensequenz markiert zur Generierung von Restriktionsschnittstellen angefügte Nukleotide. Die Großbuchstabensequenz ist komplementär zur plastidären Tabak-DNA (ptDNA).

2.2.5.2 Biolistische Transformation der Tabakblätter

Die Pflanzenanzucht, die Präparation der Goldpartikel und der Beschuss der Blätter erfolgten durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Organellenbiologie, Biotechnologie und Molekulare Ökophysiologie“ von Prof. Dr. R. Bock (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm).

Für die Plastiden-Transformation wurden sterile Blätter von 3 bis 4 Wochen alten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*, *Petit Havana*) genutzt. Für den Gentransfer wurden die Vektorkonstrukte pSH6, pSH7, pSH15 und pSH16 (Tabelle 2.1) auf etwa 0,6 µm große Goldpartikel geschichtet, welche dann unter Benutzung einer Partikelkanone durch hohen Druck in die Plastiden der Tabakblätter geschossen wurden. Der Beschuss erfolgte direkt nach der Partikelpräparation. Pro Konstrukt wurden zwei Heptaschüsse durchgeführt. Die Vakuumpumpe wurde eingeschaltet und die Heliumflasche geöffnet, bis das rechte Manometer sich bewegte. Daraufhin wurde sie noch um eine weitere halbe Drehung geöffnet. Auf dem linken Manometer wurde der Grenzdruck auf 1350 psi eingestellt. Er sollte in der Regel 250 psi höher sein als der Druck, bei dem die *Rupture disk* bricht. In Vorbereitung eines Heptaschusses wurde mit einer sterilen Pinzette je ein *Macrocarrier* in eines der sieben Öffnungen der Halterung gelegt und an den Rändern vorsichtig festgedrückt. Unmittelbar vor dem Auftropfen auf den *Macrocarrier* wurde die Goldsuspension durch Pipettieren und Vortexen nochmals gründlich resuspendiert. Je 6,5 µl dieser Suspension wurden mit einer P20-Pipette und einer P2-Pipettenspitze auf den in die Halterung eingesetzten *Macrocarrier* getropft und im Luftstrom der Sterilbank getrocknet. Die *Rupture disk* wurde in die mit Helium betriebene Partikelkanone eingelegt, die *Stopping screen* und die Halterung mit den *Macrocarrier* zusammengebaut und beides in die oberste mögliche Einschubebene der Kanonenkammer eingesetzt. Anschließend wurde die offene Petrischale mit den Tabakblättern in die Halterung gestellt, so dass zwei freie Einschubebenen zwischen der Halterung mit den sieben *Macrocarrier* und Petrischale vorhanden waren sowie die Kammer der Kanone evakuiert. Erreichte das Vakuum 25 Inches in der Quecksilbersäule, wurde der *Fire-Knopf* gedrückt und gedrückt gehalten, bis das Gas die *Rupture disk* bei ca. 27 Inches Quecksilber und 1100 psi Heliumdruck brach. Nach dem Schuss wurde das Vakuum sofort abgeschaltet und die Kammer belüftet. Gelangten während des Partikelbeschusses einige Blätter von der Petrischale in die Kanonenkammer, wurden diese mit einer sterilen Pinzette wieder auf den Filter der dünnen RMOP-Platte gelegt. Die Petrischale wurde mit einem Deckel und einem Frischhaltefolienstreifen luftdicht verschlossen. Nach Abschluss der biolistischen Transformation wurde das Ventil der Gasflasche zuge dreht, das Vakuum eingeschaltet und solange der *Fire-Knopf* gedrückt gehalten, bis beide Manometer auf Null standen, dann das zweite Ventil ebenfalls geschlossen, die Kammer belüftet sowie die Kanone und die Vakuumpumpe ausgeschaltet.

2.2.5.3 Regenerationszyklen

Nach dem biolistischen Beschuss der Tabakblätter wurden diese in etwa 5x5 mm große Stücke geschnitten und auf RMOP-Medium mit Zusatz von Spectinomycin gelegt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 4 Wochen zeigten sich erste Kalli, die wiederum in kleinere Stücke (etwa 2x2 mm) geschnitten und auf frisches Selektionsmedium gebracht wurden. Die Inkubation fand in der Phytokammer bei 16 h Licht und 25°C, bei 8 h Dunkelheit und 20°C sowie bei einer Lichtintensität von ca. 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ statt. Jeder Kallus durchlief drei dieser Regenerationszyklen, bevor er in eine Magentabox mit ca. 50 ml RM-Medium mit Zusatz von Spectinomycin gesetzt wurde.

2.2.6 Plastidentransformation zur Herstellung der Tabak-*rpoB*-core-Promotormutanten

2.2.6.1 Klonierungsstrategie

Die Klonierungsstrategie ist ausführlich bei Legen (2002) beschrieben.

2.2.6.2 Nachweis der Punktmutation im *rpoB*-core-Promotor

Der Nachweis der Punktmutation erfolgte über Sequenzierung mit dem Primerpaar 5'*PrpoB*-345-seq/3'*PrpoB*-345-seq (Tabelle 2.3; Kapitel 2.2.4.8).

2.2.6.3 Nachweis der Integration des Transgens ins Plastom und Homoplasmietest

Der Homoplasmietest wurde von Dr. Julia Legen mittels *Southern Blot*-Analyse durchgeführt (Legen, 2002).

2.2.7 Southern Blot-Analyse

2.2.7.1 Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden und Detektion von DNA

Für die Herstellung der *psaB*-DNA-Sonde wurde aus dem Genom von *Nicotiana tabacum* die entsprechende genspezifische Sequenz mittels genspezifischen Primern in einer PCR amplifiziert. Die GUS- und GFP-DNA-Sonden wurden aus pSH1 bzw. pSH2 amplifiziert (Kapitel 2.2.4.5). Die Sequenzen für die Primer sind in der nachfolgenden Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: Primer für die Herstellung von DNA-Sonden

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	5'-Nukleotidposition in ptDNA ⁵
5' <i>NtpsaB</i> 3' <i>NtpsaB</i>	GTTTACCATGAGCGATTGTATC CGCAAAGTTTATGGCTGACTGAT	39800 40415
5' <i>NtSHGFP</i> 3' <i>NtSHGFP</i>	ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTG TTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG	-
5' <i>NtSHGUS</i> 3' <i>NtSHGUS</i>	GGCCAATGGTGATGTCAGC GCTCTTTAATCGCCTGTAAGTGC	-

Die jeweiligen PCR-Produkte dienten als *template* für eine weitere PCR, mittels der die radioaktiv markierte DNA-Sonde hergestellt wurde. Für einen 20 µl-Reaktionsansatz wurden 100 ng des *templates*, 20 pmol des reversen Primers, jeweils 1,5 nmol dATP, dGTP und dTTP, 1x *Taq*-Reaktionspuffer und 2,5 U *Taq* DNA-Polymerase (QIAGEN) eingesetzt. Zum Schluss wurde 50 µCi [α - 32 P]-dCTP zugegeben. Die Amplifikation erfolgte durch ein Standard-PCR-Programm mit 35 Zyklen (Kapitel 2.2.4.5). Die DNA-Sonde wurde zur prä-hybridisierten Membran (Kapitel 2.2.7.2) gegeben, wobei der Hybridisierungspuffer (10 ml) ausgetauscht wurde. Die Hybridisierung der radioaktiven DNA-Sonde erfolgte ü.N. bei 65°C. Aufbewahrte Sonden wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, bevor sie zur Membran gegeben wurden.

2.2.7.2 Membrantransfer

Gemäß der *Southern Blot*-Methode (Southern, 1975) wurde das durch elektrophoretische Auftrennung gewonnene DNA-Migrationsmuster unter Ausnutzung der Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran Hybond N⁺ (Amersham, Pharmacia Biotech) transferiert. In Vorbereitung auf den DNA-Transfer wurde das Agarosegel nach erfolgter Elektrophorese 15 min im Depurinierungs-, anschließend für je 30 min im Denaturierungs- und Neutralisationspuffer inkubiert sowie Hybond N⁺ in 10x SSC Transferpuffer äquilibriert. In einem Kapillarblot wurde die DNA aus dem prä-inkubierten Agarosegel für 20 h mit 10x SSC als Transferpuffer auf die Nylonmembran gezogen. Zwei zuvor mit 10x SSC befeuchtete Filterpapiere (3MM Whatman) wurden auf die Glasplatte platziert, wobei ihre Enden in die Pufferwanne eintauchten. Von unten nach oben wurden zwei weitere Filterpapiere, das Gel mit der Taschenöffnung nach oben, die Nylonmembran – abgedichtet zu allen Seiten mit Parafilm – und drei bis vier Lagen Filterpapiere luftblasenfrei platziert. Die Pufferwanne wurde mit 10x SSC gefüllt. Der *Blot*-Aufbau wurde mit saugfähigen Kleenex-Tüchern 10 bis 15 cm hoch überschichtet. Beschriftet wurden sie mit einem Gewicht.

Die Transferleistung wurde durch Betrachtung des Gels unter UV-Licht bestätigt. Die DNA wurde durch Bestrahlung der Nylonmembran mit UV-Licht (150 s) und einer Energiemenge von 150 mJ kovalent auf die Membran gebunden. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran für 5 min in 2x SSC gewaschen und im Hybridisierungssofen bei 65°C mit der Hybridisierungslösung für 2-3 h prä-hybridisiert und zum Nachweis der Integration des Transgens bei 65°C mit [α - 32 P]-dCTP-markierter DNA-Sonde (Kapitel 2.2.7.1) über Nacht inkubiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran zur Entfernung unspezifischer Bindungen bei 65°C jeweils für 10 min mit abnehmender Salzkonzentration mit Waschpuffer 1 und 2 gewaschen, in Klarsichtfolie eingeschlagen und im Anschluss für 12 h auf *K-Type Imaging Screen* bei RT exponiert. Visualisiert wurde die *Imaging Screen* mittels Personal FX Scanner und der Software QuantityOne (BioRad).

Depurinierungspuffer:	0,25 M HCl in <i>A. bidest.</i>
Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH und 0,8 M NaCl in <i>A. bidest.</i>
Neutralisationspuffer:	0,5 M Tris/HCl (pH 7) und 0,5 M NaCl in <i>A. bidest.</i>
20x SSC:	0,3 M Natriumcitrat; 3 M NaCl in <i>A. bidest.</i>
Hybridisierungspuffer:	7% SSC und 0,25 M Na ₂ HPO ₄ in <i>A. bidest.</i>
Waschpuffer 1:	2x SSC und 0,1% (w/v) SDS in <i>A. bidest.</i>
Waschpuffer 2:	0,1x SSC und 0,1% (w/v) SDS in <i>A. bidest.</i>

2.2.7.3 Regeneration der Membran

Um die hybridisierten Sonden von der Membran abzulösen, wurde sie zweimal für 10 min in 0,1% (w/v) SDS gekocht und anschließend in 2x SSC gespült. Danach wurde die Membran in Frischhaltefolie aufbewahrt und konnte mit einer neuen Sonde hybridisiert werden.

2.2.8 Primer Extension-Analysen

Die *Primer Extension*-Reaktionen wurden mit 15-20 µg RNA von 8-Tage-alten Tabakpflanzen gemäß dem Protokoll von (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

2.2.8.1 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Es wurden 10 pmol Oligonukleotide (Tabelle 2.9) in 10 µl-Reaktionsvolumina mit 1x PNK-Reaktionspuffer A (MBI Fermentas), 10 U T4 Polynukleotidkinase und 50 µCi [γ - 32 P]-ATP bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von 40 µl 1x Hybridisierungspuffer (10x: 1,5 M KCl; 0,1 M Tris, pH 8,3; 10 mM EDTA) wurden die Primer durch Zentrifugation bei RT und 735×g für 2 min unter Verwendung von MicroSpin™ G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) von freien Nukleotiden getrennt. Die Markierungsrate wurde mittels *Radioisotope Counting* unter Verwendung von *Quick Count 2000* (Bioscan) bestimmt.

Tabelle 2.9: Oligonukleotide eingesetzt für die *Primer Extension*

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	5'-Nukleotidposition in ptDNA ²
PENtrpoB-156	CGTATGAACGGAGGAAGAAAGAGAA	27667
PENtrpoB-210	TGGAATTTTCAACAGATACAAATGG	27721
PENtrpoB-251	CATCCCTAGAAACAGACTTCTGCTACTTAGAC	27762
PENtrpoB-352	TGATAATACACATTCCAACCTGCTT	27863
PENtrpoB-484	CCCCTTTTCTGTTATGGATTTCGT	27995
PENtrpoB-662	ATTGTCGTTCTCTGTTCTATTTCGGG	28173
PENtaadA-702	CCGTCGTTCAATGAGAATGGATAAG	-
PEmCEaada-831	GGTTATCGCCGAAGTATCAACTCAA	-
PEmCEaada-858	ATCAGAGGTAGTTGGCGTCATCG	-
PEmCEaada-994	GATGAAACAACGCGGCGAG	-
PEmCEaada-1292	CTGAACAGGATCTATTTGAGGCGCT	-
PEmCEaada-1477	TATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTA	-
PEmCEaada-1578	GAAAGGCGAGATCACTAAGGTAGTTGG	-
PEmCEaada-2024	TAAAGCGGATGTAACCTCAATCGGTAGAG	-

2.2.8.2 Anlagerung von Oligonukleotiden an RNA

Die Anlagerung von Oligonukleotiden an 15-20 µg Gesamt-RNA aus sieben-Tage-alten Tabakpflanzen erfolgte in 15 µl-Ansätzen mit 0,6 pmol [γ - 32 P]-ATP-endmarkierten Primers in 10x Hybridisierungspuffer. Für das Auftrennen von Sekundärstrukturen der RNA wurden die Proben für 5 min bei 85°C erhitzt, kurz zentrifugiert und schnellstmöglich bei 42°C für 3 h im Heizofen inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit angelagertem Primer mit $\frac{1}{10}$ Vol 3 M NaAc, pH 5,2 und 2,5 Vol 96% (v/v) Ethanol bei -20°C ü.N. gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 16000×g für 15 min sedimentiert und das Sediment mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen.

2.2.8.3 Synthese und Aufreinigung der cDNA

Die cDNA-Synthese wurde in 20 µl-Reaktionsvolumina unter Einsatz von sedimentierter RNA mit angelagertem Primer, 1 µg Actinomycin D, 4 U RNase-Inhibitor, 200 nmol DTT und je 20 nmol dATP, dCTP, dTTP und dGTP durch 20 U Superscript III MMLV Reverse Transkriptase in Reverse-Transkriptasepuffer (Invitrogen) katalysiert. Das gut gelöste RNA-Primer-Sediment wurde bei 50°C für 2 h im Heizofen inkubiert. Anschließend erfolgte der RNA-Abbau durch Zugabe von 0,5 nmol EDTA und 5 ng RNase A und Inkubation bei 37°C für 30 min. Die cDNA wurde mit 150 µl 1x TEN und (10x: 0,1 M Tris, pH 7,6; 10 mM EDTA; 1 M NaCl) 500 µl 96% (v/v) Ethanol extrahiert und präzipitiert. Die cDNA-Sedimentierung wurde durch eine Zentrifugation bei 4°C und 16000×g für 15 min erreicht. Es folgte die Waschung des Sediments mit 80% (v/v) Ethanol und Trocknung an der Luft. Für die Detektion in denaturierenden Polyacrylamidsequenzgelen wurde die cDNA in 5 µl Formamidladepuffer gelöst (siehe Kapitel 2.2.4.4.3). Um die 5'-Transkriptenden kartieren zu können, wurden Sequenzleitern unter Verwendung derselben Oligonukleotide (Tabelle 2.9) sowie der amplifizierten PCR-Produkte (Tabelle 2.4) mittels USB Sequenase 2 (USB, USA) nach Herstellervorgaben generiert.

2.2.9 Chloroplastenisolation

Die Isolation von Chloroplasten aus *Nicotiana tabacum* wurde nach einem modifizierten von (Gruissem et al., 1986) durchgeführt. Die Anzucht von Wildtyp und mutagenisierten Pflanzen erfolgte wie unter Kapitel 2.2.1 beschrieben. Alle Arbeitsschritte zur Chloroplastenisolation wurden bei 4°C durchgeführt. Sechs Gramm Blätter 12-Wochen-alter Pflanzen wurden in einem *Waring blender* in 150 ml Isolationspuffer (25 mM Hepes-KOH pH 7,6; 350 mM Sorbitol, 0,4 mM Na-Isoascorbat; 2 mM EDTA) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch drei Lagen Miracloth (Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA, USA) filtriert und anschließend in einer Sorvall-Zentrifuge (GS-3 Rotor) zentrifugiert (2000xg, 6 min, 4°C). Das erhaltene Sediment wurde in 2 ml Isolationspuffer mittels Pinsel vorsichtig resuspendiert und in einem diskontinuierlichen 40% /80%-Percoll-Gradienten in einer Sorvall-Zentrifuge (HB-6 Rotor) zentrifugiert (6500xg, 4°C, 20 min; ohne Bremse). Intakte Chloroplasten wurden an der Gradienteninterphase gesammelt, mit Isolationspuffer auf 40 ml verdünnt und erneut in einer Sorvall-Zentrifuge (HB-6 Rotor) zentrifugiert (2000xg, 4°C, 3 min; ohne Bremse). Das resultierende Chloroplasten-Sediment wurde in 100-200 µl Isolationspuffer resuspendiert und die Chloroplastenzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Laboroptik GmbH, Deutschland) bestimmt. Die Chloroplasten wurde anschließend für die *run-on*-Transkription verwendet (Kapitel 2.2.10). Die Isolation von Chloroplasten aus sieben-Tage-alten Tabak erfolgte wie oben beschrieben aus 3 g Pflanzenmaterial.

2.2.10 Run-on-Transkription

Die *run-on*-Transkription erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Mullet und Klein (1987). Hierzu wurden 5×10^7 Chloroplasten in 45 µl Puffer D (50 mM Tris-HCl pH 7,0; 10 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 3 mM β-Merkaptoethanol) durch Auf- und Abpipettieren mechanisch aufgeschlossen. Nach Zugabe von 50 µl Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 0,2 mM CTP, GTP, ATP; 0,01 mM UTP; 50 µCi [α -³²P]-UTP (Amersham); 40 U of RNase-Inhibitor (Fermentas); 10 mM β-Merkaptoethanol) wurde der Ansatz für 10 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM EDTA; 5% Sarcosyl) beendet. Die radioaktiven *run-on*-Transkripte wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und einer Ethanol-fällung unterzogen. Anschließend wurden die Transkripte in 50 µl H₂O resuspendiert, für 5 min bei 95°C denaturiert und mit jeweils 1 µg genspezifischen DNA-Fragmenten bei 58°C ü.N hybridisiert. Diese wurden zuvor aus Plasmid-DNA durch PCR mit den in Tabelle 2.6 aufgeführten Oligonukleotidpaaren amplifiziert und mit Hilfe einer *96-well Bio-Dot* Mikrofiltrationsapparatur (BioRad) und UV-Vernetzung auf einer Nylon Hybond-N⁺ Membran (Amersham) fixiert (siehe Kapitel 2.2.4.11). Nach der Hybridisierung wurden die Membranen für jeweils 5 bis 10 min in Waschpuffer I (0,5x SSC/ 0,1% SDS; vorgewärmt auf 58°C) und II (0,2x SSC/ 0,1% SDS; vorgewärmt auf 58°C) gewaschen, in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf einem *Imaging Screen* für mindestens 12 h in einer lichtgeschützten Kassette exponiert. Die Hybridisierungsergebnisse wurden durch Autoradiographie in einem Phosphorimager (*Molecular Imager FX*, BioRad) analysiert. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms QuantityOne. Für das Entfernen der hybridisierten *run-on*-Transkripte von der Membran, wurde die Membran zweimal für 20 min in 5 mM EDTA/ 0,1% (w/v) SDS gekocht und anschließend in Frischhaltefolie aufbewahrt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswirkungen der Cytokininapplikation bei *Nicotiana tabacum*

Cytokinine spielen eine zentrale Rolle im Zellzyklus und beeinflussen viele Aspekte des Pflanzenwachstums. Zahlreiche Arbeiten beschreiben ihren regulierenden Einfluss auf verschiedene Entwicklungsprozesse, wie die Entwicklung und Funktion von Chloroplasten. Obwohl von Effekten auf die Transkription in den Chloroplasten berichtet worden ist, sind jedoch bis heute die molekularen Mechanismen der Cytokininaktionen in den Plastiden noch nicht detailliert verstanden (Überblick in Mok, 1994; Mok und Mok, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Serie von Experimenten durchgeführt, um Cytokinineffekte auf die Transkription von Plastidengenen zu analysieren. Die folgenden Abschnitte untersuchen die Auswirkungen der Cytokininbehandlung auf die Transkription und die Transkriptakkumulation plastidärer Gene sowie Kerngene für die plastidären RNA-Polymerasen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstatus von Tabak und Arabidopsis. Ähnliche Transkriptanalysen wurden mit cytokinindefizienten, transgenen *Nta:AtCKX2* Tabak- sowie *Ath:CKX2* Arabidopsis-Pflanzen durchgeführt. Bei denen war der endogene Cytokiningehalt herabgesetzt.

3.1.1 Wahl der Methoden zur Analyse der Transkription sowie Transkriptakkumulation

Zur Bestimmung des Ausmaßes der transkriptionellen Regulation der Chloroplastengene während der Phytohormonbehandlung wurde ein plastidäres *run-on*-Transkriptionssystem verwendet. Es liefert den Vorteil, dass Chloroplastenlysate die Transkription innerhalb eines kurzen definierten Zeitraums in Anwesenheit von radioaktiven NTPs weiterführen können (Mullet und Klein, 1987). Dabei geben die so markierten RNAs Auskunft über die Menge von neu gebildeten Transkripten und somit von der Transkriptionsrate bzw. -aktivität als Funktion der Plastidenzahl. Die hier verwendete *run-on*-Assay-Methode basiert auf genspezifische Doppelstrangsonden, die im Überschuss auf die Nylonmembran aufgetragen worden waren.

Die Transkription von Genen des Tabak- und Arabidopsis-Plastoms wurde untersucht, indem [α - 32 P]-UTP-markierte *run-on*-Transkripte aus Chloroplastenlysaten mit DNA-Fragmenten von bis zu 20 Plastidengenen auf einer Nylonmembran hybridisiert wurden. Die ausgewählten Gene (*atpB*, *atpH*, *atpF*, *ndhB*, *ndhF*, *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psbA*, *psbB*, *psbE*, *accD*, *rrn16*, *rbcL*, *rps4*, *rps8*, *rpl23*, *petB*, *petD*, *rpoB*) repräsentieren funktionell wichtige

Gruppen von Chloroplastenproteinen und RNAs sowie NEP- und PEP-transkribierte Gene (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Chloroplastengene, die in *run-on*-Assays analysiert wurden.

Gen	Genprodukt
<i>accD</i>	Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase
<i>atpB, atpF, atpH</i>	Untereinheiten der ATPase
<i>ndhB, ndhF</i>	Untereinheiten der NAD(P)H-Dehydrogenase
<i>petB, petD</i>	Untereinheiten des Cytochrom b ₆ /f Komplexes
<i>psaA, psaB</i>	Untereinheiten des P700 Apoprotein vom Photosystem I
<i>psaC</i>	Eisen-Schwefel-Zentrum von Photosystem I
<i>psbA, psbB, psbE</i>	Untereinheiten von Photosystem II
<i>rbcL</i>	große Untereinheit von RuBisCo
<i>rpl23</i>	ribosomales Protein L23
<i>rpoB</i>	β-Untereinheit der PEP
<i>rps4</i>	ribosomales Protein S4
<i>rps8</i>	ribosomales Protein S8
<i>rrn16</i>	16S ribosomale RNA

Veränderungen in der Transkriptionsrate von plastidären Genen führen nicht notwendigerweise zu vergleichbaren Änderungen in deren Transkriptakkumulationen. In dieser Arbeit wurden für ausgewählte plastidäre sowie kernkodierte Gene deren Transkriptakkumulation mittels quantitativer *real-time* RT-PCRs bestimmt.

3.1.2 Senescente Blätter vom Wildtyp-Tabak

Chloroplasten sind in die Regulation der Blattseneszenz involviert (Chory, 1994; Kulaeva et al., 2002; Zapata et al., 2005). Cytokinin ist wiederum dafür bekannt, Seneszenzerscheinungen sowie den Abbau von Chlorophyllen in abgeschnittenen Blättern zu verzögern (Gan und Amasino, 1997; Lim et al., 2007; Mok und Mok, 2001; Kakimoto, 2003). Um zu untersuchen, ob Cytokinin auch einen Einfluss auf die Transkription in den Chloroplasten hat, wurden 12-Wochen-alte Tabakblätter unter konstantem Starklicht mit 6-Benzyladenin (BA, 5 µM) für 15, 30, 60, 120 und 180 min behandelt (Kapitel 2.2.3). Nach

der Inkubation wurden aus dem Gesamtblatt Chloroplasten isoliert und für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet (Kapitel 2.2.10). Radioaktiv markierte Transkripte wurden mit DNA-Fragmenten von bis zu 20 Plastidengen auf einer Nylonmembran hybridisiert und die Signale quantifiziert (Kapitel 2.2.4.112.2.10; Abbildung 3.2).

3.1.2.1 *Transkription in den Chloroplasten seneszenten Blätter vom Wildtyp-Tabak*

Erst unter Berücksichtigung des Transkriptionsmusters in den Chloroplasten unbehandelter Tabakblätter in Wasser lässt sich die Auswirkung der Cytokininapplikation auf die Chloroplastentranskription bestimmen. So zeigten die *run-on*-Daten für die ausgewählten Gene im untersuchten Zeitraum von drei Stunden keine stabile Transkriptionsaktivität. In Abbildung 3.1 wurden die Plastidogene hinsichtlich ihrer Transkriptionsrate in drei Gruppen unterteilt: (A) stark, (B) mittelstark sowie (C) schwach transkribierte Gene. Für die Plastidogene (A) *psaA*, *psaB*, *psbA*, *rrn16*, *rbcL*, (B) *atpB*, *ndhB*, *psbB*, *psbE*, *rps4*, *petB* und *petD* konnte in den ersten zwei Stunden eine stetige Steigerung der Transkription beobachtet werden. Nach 120 min Inkubation der seneszenten Tabakblätter in Wasser wiesen *psbE* und *rrn16* unter den hier untersuchten Genen die stärkste Zunahme ihrer Transkriptionsrate auf. Es folgten *psbA*, *psbB*, *ndhB*, *rbcL*, *petB* und *petD*. Eine im Vergleich zum 15 min-Wert 2,4-2,6fache Zunahme der Transkription wurde für *psaA*, *rps4* und *atpB* beobachtet. Für die Plastidogene *accD* sowie *psaB* kam es in den ersten zwei Stunden nur zu einer minimalen Steigerung ihrer Transkriptionsaktivität. Dabei erreichte *accD* bereits nach 30 min seine maximale Transkription. Für *rpl23*, *atpH*, *ndhF* und *rps8* kam es nur bis zur 60. Minute zu einem stetigen Anstieg der Transkription. Nach 120 min näherten sich ihre *run-on*-Transkriptmengen wieder an die Werte zu Beginn der Zeitreihe an. Für die Mehrheit der analysierten Gene wurde jedoch nach drei Stunden Inkubation der Tabakblätter im Wasser eine im Vergleich zum 15 min-Wert verringerte Transkription beobachtet (*accD*, *rps8*, *petD*, *petB*, *psaA*, *psaB*, *psbE*, *rpl23*, *rbcL*, *psbB*, *ndhB*, *ndhF*, *psbA*, *atpH*, *rrn16*, *atpB*). Abweichungen vom zeitlichen Transkriptionsmuster waren für *atpF*, *psaC* und *rpoB* zu verzeichnen. Ersteres zeigte, wie *accD*, seine maximale Transkription bereits nach 30 min. Jedoch sank sie im weiteren Verlauf der Inkubation, um dann nach 180 min wieder auf den 15 min-Wert zu steigen. Das *run-on*-Transkript von *psaC* nahm bis zur 60. Minute stetig ab, stieg kurze Zeit an und fiel schließlich nach 180 min auf ein Zehntel des Anfangswerts. Die kurzzeitige Aktivierung der Transkription der Plastidogene könnte durch einen Lichtstress-induzierten Anstieg des endogenen Cytokiningehalts in den Tabakblättern hervorgerufen worden sein. Alternativ spiegelten die *run-on*-Transkriptmengen möglicherweise eine

circadiane Transkriptionsrhythmik wider, die sich unter konstanten Lichtbedingungen fortgesetzt zu haben scheint.

Im Unterschied zu allen anderen untersuchten Plastidengen nahm *rpoB* in dem hier untersuchten Zeitraum in seiner Transkriptionsrate stetig ab. Nach 180 min sank seine *run-on*-Transkriptmenge auf 30% des Anfangswerts (15 min). Die kontinuierliche Verringerung seiner Transkriptionsaktivität trägt vielleicht zur nach 3h Inkubation der abgeschnittenen Blätter im Wasser beobachteten Abnahme der Transkription bei der Mehrheit der analysierten plastidären Gene bei.

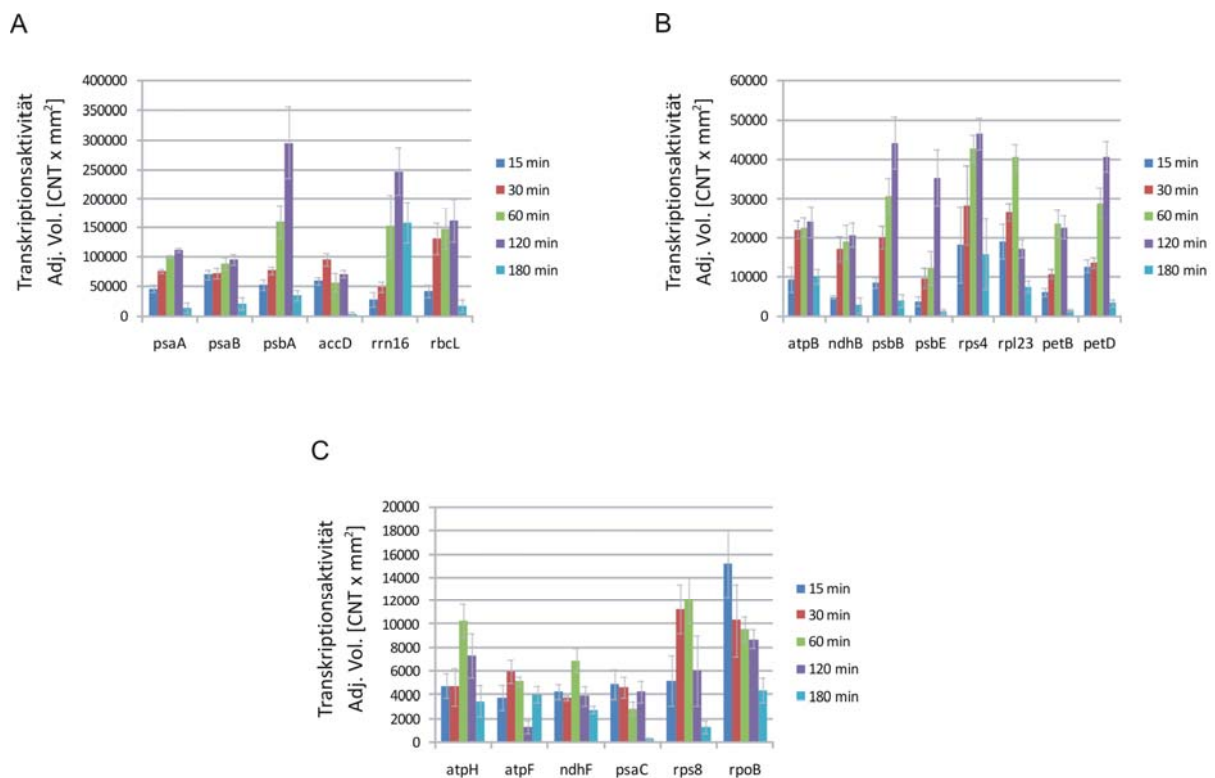


Abbildung 3.1: Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten von seneszenten Tabakblättern. Abgeschnittene Blätter von 12-Wochen-alten Tabakpflanzen wurden für 24 h in Wasser unter konstantem Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) prä-inkubiert, gefolgt von weiteren 15, 30, 60, 120 und 180 min. *Run-on*-Assays mit aus dem Gesamtblatt isolierten Chloroplasten wurden durchgeführt wie im Text beschrieben. Die hier untersuchten Gene wurden hinsichtlich ihrer Transkriptsynthesestärke und zur besseren Veranschaulichung in drei Diagrammen dargestellt: (A) stark, (B) mittelstark und (C) schwach transkribierte Gene. Gezeigt sind die Mittelwerte der Transkriptionsaktivität aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SA (siehe auch Abbildung 3.2).

Abbildung 3.2F zeigt den Effekt der Cytokininbehandlung auf die Transkription in den Chloroplasten von abgeschnittenen, seneszenten Tabakblättern, angegeben als Verhältnis der Transkriptionsraten in Chloroplasten aus Cytokinin-behandelten Tabakblättern zu denen in Chloroplasten aus Kontrollblättern (im Wasser). BA/H₂O-Ratios <1 entsprechen hierbei einer Abnahme, BA/H₂O-Ratios >1 einer Zunahme in der Transkriptionsaktivität der Chloroplastengene in BA-behandelten Tabakblättern. Mit wenigen Ausnahmen reagierten die

Chloroplasten auf die 15-minütige Cytokininbehandlung mit einer Abnahme der Transkriptsynthese der plastidären Gene. So waren nach 15 min die Transkriptionsraten von *atpF*, *ndhB*, *ndhF*, *psaB*, *psaC* und *petB* um die Hälfte verringert. Weniger stark war die Abnahme der Transkription von *atpB*, *atpH*, *psaA*, *psbA*, *psbE*, *rps4*, *rpl23*, *rpoB*, *rrn16* und *rps8*. Stabil blieben in den behandelten Tabakblättern im Vergleich zu den Kontrollblättern die *psbB*, *accD*, *rbcL* und *petD* *run-on*-Transkripte. In der 30. Minute kam es in der Mehrheit zu einer weiteren Abnahme der Chloroplastentranskription in den BA-behandelten Blättern. Zu den Genen mit der stärksten Abnahme ihrer Transkriptsynthese zählten dabei *petD*, *rpoB*, *petB*, *rps4*, *accD*, *atpB*, *psaA*, *psbB*, *rrn16* und *atpH*. Die Transkriptionsaktivität blieb auch für *rps8*, *ndhF*, *psbA*, *psaB* und *psaC* unter/um die Hälfte der beobachteten Aktivität in den Kontrollblättern. Während die *run-on*-Transkriptmenge von *rbcL* nach 15 min Cytokininbehandlung stabil blieb, wurde in der 30. Minute nur noch 30% der *run-on*-Transkriptmenge in den behandelten Blättern gebildet. Im Vergleich zum 15 min-Wert bewirkte die 30-minütige exogene BA-Zufuhr keine weiteren Änderungen in der Transkriptionsaktivität von *atpF*, *psbE* und *rpl23*. Die Akkumulation der *ndhB* *run-on*-Transkriptmenge näherte sich sogar der in den unbehandelten Tabakblättern an. Ab der 60. Minute nahm die Menge der *run-on*-Transkripte der analysierten Gene zu, blieb jedoch noch unter denen der Wasserkontrollen. Ausnahmen bildeten *rpl23* mit einer erneuten Abnahme der Transkriptsynthese nach 60 min sowie *psbE* nach 120 min der BA-Applikation. Interessanterweise wurde dieser negative Effekt von Cytokinin auf die Transkription der Chloroplastengene zu einem Zeitraum entdeckt, wo die Transkriptionsaktivität in den unbehandelten Tabakblättern stetig zunahm. Aufgrund dieses allgemeinen Anstiegs der Transkriptsynthese reagierten womöglich die Chloroplasten auf die zusätzliche exogene BA-Zufuhr mit einer Reduzierung der plastidären Transkriptionsaktivität.

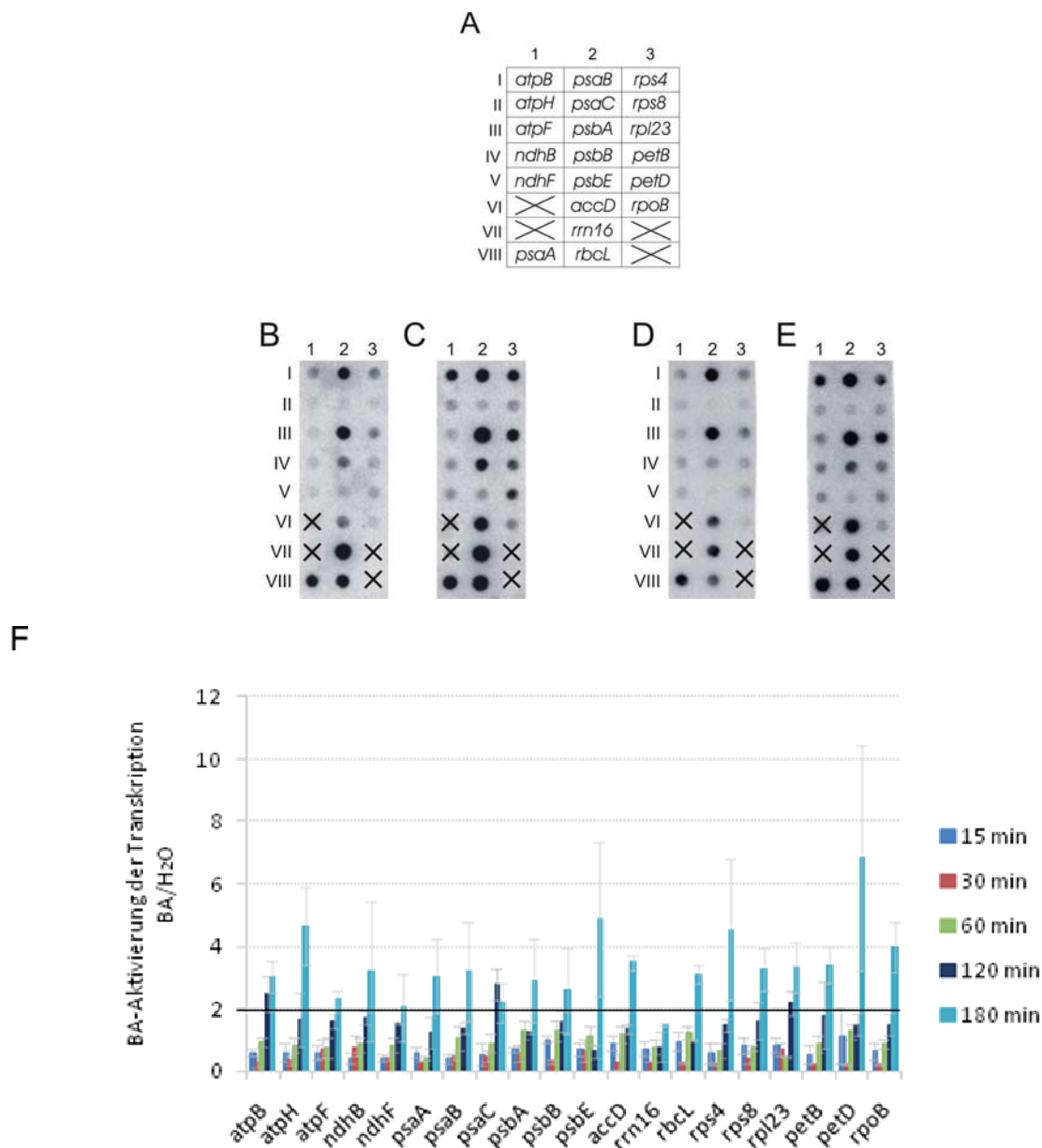


Abbildung 3.2: Cytokinineffekt auf die Transkription in Chloroplasten von seneszenten Tabakblättern. Abgeschnittene Blätter von 12-Wochen-alten Tabakpflanzen wurden für 24 h in Wasser unter konstantem Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) prä-inkubiert, dann für 15, 30, 60, 120 und 180 min im Licht in Wasser oder BA inkubiert. Chloroplasten aus dem gesamten Blattmaterial wurden isoliert und 5×10^7 für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet. [^{32}P]-markierte *run-on*-Transkripte wurden isoliert und mit den auf einer Nylonmembran zuvor nach Schema (A) aufgetragenen plastidären Gensonden hybridisiert. (B-E) *Dot-Blot* Autoradiogramme für ausgewählte plastidäre Gene zeigen einen Cytokinineffekt auf die Transkription in Chloroplasten nach 180 min. Die Hybridisierung erfolgte mit *run-on*-Transkripten aus Chloroplasten vom Tabakblatt, inkubiert in Wasser (B, D) oder BA-Lösung (C, E). B+C und D+E repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Die für die repräsentativen *Dot-Blots* gezeigten Daten können ein wenig von den Mittelwerten aus den mehrmals durchgeführten Experimenten (F) abweichen. (F) Das Histogramm zeigt die Transkriptionsraten in Chloroplasten aus Cytokinin-behandelten Tabakblättern zu denen in Chloroplasten aus Kontrollblättern (im Wasser) als Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten \pm SA. Die schwarze Linie markiert den Schwellenwert ($=2,0$) für eine Aktivierung der Transkription.

Der Schwellenwert für einen positiven Cytokinineffekt auf die Chloroplastentranskription wurde auf eine BA/H₂O-Ratio von 2,0 gesetzt, was einer Verdopplung der

Transkriptionsaktivität entspricht. Solch ein Effekt wurde für *atpB* (2,5) und *psaC* (2,7) bereits nach 120 min beobachtet, der nach 180 min noch beibehalten blieb. Jedoch erst die dreistündige BA-Behandlung bewirkte bei der Mehrheit der untersuchten Plastidengene, bis auf *rrn16*, eine Steigerung ihrer Transkriptionsaktivität um/über das Doppelte: um 2,0 für *atpF*, *ndhF*, *psaC*, *psbB*, um 3,0 für *atpB*, *ndhB*, *psaA*, *psaB*, *psbA*, *accD*, *rbcL*, *rps8*, *rpl23*, *petB*, um 4,0 für *atpH*, *rps4*, *rpoB* sowie um 5,0 für *psbE* (Säulen in türkis). Das Gen *petD* antwortete auf BA mit einer 7fachen Steigerung seiner *run-on*-Transkriptmenge - den größten Anstieg in der Transkriptsynthese unter den hier untersuchten Genen. Den Daten zufolge bewirkt exogenes Cytokinin zu Beginn der Behandlung eine allgemeine Verringerung der *run-on*-Transkriptmengen, um dann nach 3h Inkubation, möglicherweise aufgrund der drastischen Verringerung der Transkriptsynthese (Abbildung 3.1), einen kurzzeitigen positiven Effekt auf die Transkription in den Chloroplasten hervorzurufen. Interessanterweise konnte im Verlauf der BA-Behandlung für die *rrn16*-Transkription kein positiver Cytokinineffekt beobachtet werden. Mit einer BA/H₂O-Ratio von 1,4 nach 180 min lag die Transkriptionsrate unter den gesetzten Schwellenwert von 2,0. Zu diesem Zeitpunkt war die Transkriptionsaktivität von *rrn16* in den Wasserkontrollen im Vergleich zum 15 min-Wert noch deutlich erhöht (siehe Abbildung 3.1). Demnach könnten die Menge an *run-on*-Transkriptmengen von *rrn16* in den unbehandelten Tabakblättern zu keiner weiteren Steigerung der Transkriptsynthese durch BA geführt haben.

3.1.2.2 Transkriptakkumulation von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* in den seneszenten Blättern vom Wildtyp-Tabak

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte von Cytokinin auf die Transkription mit einer veränderten Transkriptstabilität in den Chloroplasten einhergingen, wurden die Auswirkungen von BA auf die mRNA-Mengen von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* mittels quantitativer *real-time* RT-PCR analysiert und als Verhältnis BA-behandelte zu unbehandelte Tabakblätter in Abbildung 3.3 dargestellt.

Die Behandlung mit BA bewirkte nach 15 min bei allen drei Genen eine Halbierung ihrer mRNA-Mengen, möglicherweise durch erhöhte Degradation in den abgeschnittenen Blättern. Eine Abnahme der Transkription kurz nach BA-Zugabe wurde auch für *psbA* und *rrn16* beobachtet (Abbildung 3.2). Die *rbcL*-Transkriptsynthese war hingegen stabil. Während im weiteren Verlauf der Cytokininapplikation die *run-on*-Transkriptmengen nach 30 min auf 60% (*psbA*) bzw. 30% (*rbcL*, *rrn16*) der Mengen in den unbehandelten Tabakblätter sanken,

näherten sich die *psbA*- und *rbcL*-mRNA-Mengen mit BA/H₂O-Ratios von 1,15 bzw. 0,91 den Werten in den Kontrollen an.

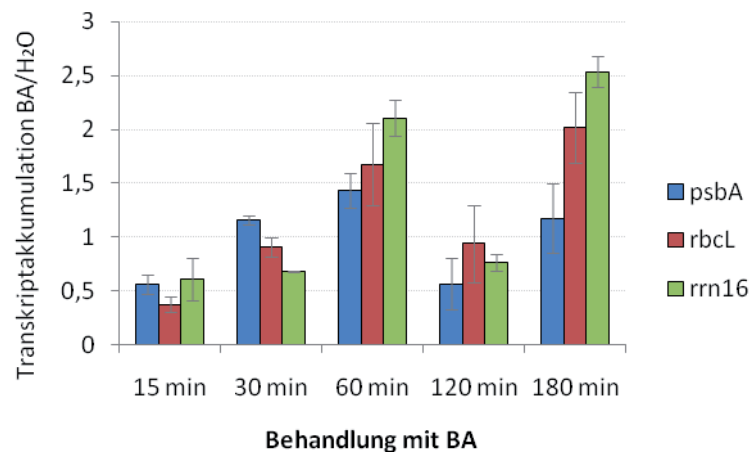


Abbildung 3.3: Cytokinineffekt auf die Transkriptakkumulation von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* in seneszenten Tabakblättern. Abgeschnittene Blätter von 12-Wochen-alten Wildtyp-Tabakpflanzen wurden in Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) für 24 h inkubiert, dann mit Cytokinin ($5 \mu\text{M}$ BA) für 15, 30, 60, 120 und 180 min behandelt. Mit der UBG-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und sind als Verhältnis BA/H₂O von vier unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt.

Hingegen unverändert in seiner im Vergleich zur Kontrolle verringerten Transkriptmenge blieb *rrn16*. Nach 60 min wurde für *psbA* und *rbcL* mit den BA/H₂O-Ratios 1,4 und 1,7 ein leicht positiver Cytokinineffekt auf die Transkriptakkumulation detektiert, im Fall von *rrn16* mit 2,1 signifikant. Auf Transkriptionsebene kam es zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zu einem leichten Anstieg der *run-on*-Transkriptmengen aller drei Gene. Vor der transkriptionellen Aktivierung von *psbA* und *rbcL* fielen jedoch ihre relativen Transkriptmengen nach 120 min. Diese Abnahme könnte ein Auslöser für die Induktion der Transkription in der 180. Minute gewesen sein (Abbildung 3.2). Nach 180 min wurden auch wieder verstärkt Transkripte akkumuliert (Abbildung 3.3). Dabei erreichte die mRNA-Menge von *psbA* die relative BA/H₂O-Ratio von 1,17, wohingegen BA die Transkriptakkumulation von *rbcL* um das Doppelte steigern ließ. Die erhöhte Transkriptstabilität resultiert wiederum vielleicht aus der verstärkten Transkriptsynthese zu diesem Zeitpunkt. Auch die *rrn16*-Transkriptmenge sank 120 min nach Cytokininbehandlung im Vergleich zum 60 min-Wert um mehr als die Hälfte und erreichte so einen Wert, der unter dem in den Wasserkontrollen lag. Während auf Transkriptionsebene für *rrn16* kein positiver Cytokinineffekt detektiert wurde, kam es nach 180 min zu einer 2,5fachen Steigerung seiner Transkriptmenge. Dies lässt einen spezifischen Einfluss von Cytokinin auf die plastidäre mRNA-Akkumulation vermuten.

3.1.2.3 *Transkriptakkumulation der Kerngene organellärer RNA-Polymerasen sowie *rpoB* in den seneszenten Blättern vom Wildtyp-Tabak*

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Expression der Komponenten des plastidären Transkriptionsapparats und des Cytokinineffekts auf die Chloroplastentranskription zu untersuchen, wurden die Transkriptmengen des kernkodierten Gens für die in den Plastiden lokalisierte Phagentyp-RNA-Polymerase (*RpoTp*) und eines seiner Zielgene, *rpoB*, analysiert. Das *rpoB/C1/C2*-Operon kodiert die β -, β' - und β'' - Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase vom Bakterientyp (PEP). Parallel wurde ebenso die Transkriptakkumulation der Kerngene *RpoTnp* und *RpoTm* analysiert. Sie kodieren für Phagentyp-RNA-Polymerasen, lokalisiert in Mitochondrien und Plastiden bzw. ausschließlich in den Mitochondrien (Liere und Börner, 2007b).

Wie bereits für die Transkriptakkumulation von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* gezeigt, bewirkte die Cytokininbehandlung nach 15 min eine Abnahme der Transkriptmengen von *RpoTp*, *RpoTm* und *rpoB* auf die Hälfte der Kontrollmengen (Abbildung 3.4). Auf Transkriptionsebene war sie auch für *rpoB* zu beobachten (Abbildung 3.2). Demnach bewirkt exogen zugeführtes Cytokinin am Anfang dieser durchgeführten Zeitreihe eine negative Regulation sowohl der Transkriptsynthese als auch der Transkriptakkumulation in den Chloroplasten der seneszenten Tabakblätter. Während es jedoch zu einer signifikanten Reduzierung der *rpoB* run-on-Transkriptmengen in der 30. Minute kam, stabilisierte sich zu diesem Zeitpunkt die mRNA-Akkumulation von *rpoB*. Im Unterschied zu den plastidären Genen *psbA* und *rbcL* nach 120 min Cytokininapplikation konnte vor der transkriptionellen Aktivierung von *rpoB* keine Abnahme in seiner Transkriptmenge beobachtet werden. Es scheint, als ob in den Chloroplasten gerade wegen der zusätzlichen BA-Zufuhr die mRNA-Menge von *rpoB* stabil gehalten wird. Vielmehr korrelierte die *rpoB*-Transkriptakkumulation während der BA-Behandlung mit der von *RpoTp*. So fielen nach der schnellen Abnahme ihrer beiden Transkriptmengen (15 min) und der anschließenden Stabilisierung in der 30. Minute nach 60 min ihre mRNA-Mengen gemeinsam auf die Hälfte der Kontrollmengen zurück. Damit erfolgte die Reduzierung der Transkriptstabilität für *RpoTp* und *rpoB* zu einem früheren Zeitpunkt als für *psbA*, *rbcL* und *rrn16* (Abbildung 3.3). In der 120. Minute nahmen die BA/H₂O-Ratios der Transkriptmengen von *RpoTp* auf 0,7 und die von *rpoB* auf 1,0 zu. Nach 180 min BA-Behandlung verhielten sich die beiden Transkriptmengen reziprok. Während im Vergleich zur Kontrolle *rpoB* in seiner Transkriptakkumulation auf die Hälfte reduziert war, kam es in den BA-behandelten Blättern zu einem leichten Anstieg von *RpoTp*-Transkripten. Somit bewirkte die Steigerung der *rpoB*-Transkription in der 180. Minute, wie

für *psbA*, *rbcL* und *rrn16*, keine erhöhte Transkriptstabilität. Die Transkriptakkumulation von *RpoTmp* blieb sogar in den ersten zwei Stunden der BA-Behandlung unbeeinflusst. Erst nach 180 min ist ein erhöhtes BA/H₂O-Verhältnis von 1,7 zu beobachten. Folglich scheint die beobachtete transkriptionelle Aktivierung der Chloroplastengene in der 180. Minute durch exogenes BA (Abbildung 3.2) nicht von der Stabilität der *RpoTp*-, *RpoTmp*- und *rpoB*-Transkripte beeinflusst zu werden.

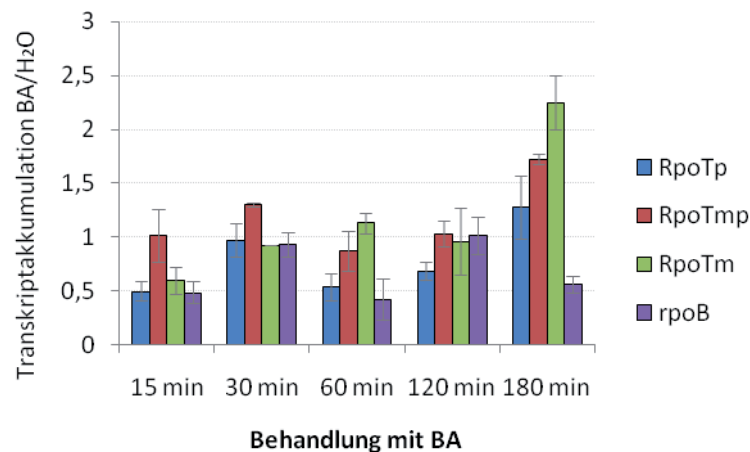


Abbildung 3.4: Cytokinineffekt auf die Transkriptakkumulation von *RpoTp*, *RpoTmp*, *RpoTm* sowie *rpoB* in seneszenten Tabakblättern. Abgeschnittene Blätter von 12-Wochen-alten Wildtyp-Tabakpflanzen wurden in Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) für 24 h inkubiert, dann mit Cytokinin ($5 \mu\text{M}$ BA) für 15, 30, 60, 120 und 180 min behandelt. Mit der UBQ-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und sind als Verhältnis BA/H₂O von vier fünf unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt.

RpoTm reagierte dagegen auf die BA-Behandlung kurzzeitig mit einer Halbierung seiner mRNA-Menge, stabilisierte sich jedoch im weiteren Verlauf der Cytokininbehandlung, um schließlich, überraschenderweise, nach 3h im Vergleich zu den unbehandelten Blättern sogar mehr als das Doppelte zu akkumulieren. Das könnte möglicherweise eine Funktion von Cytokinin in den Mitochondrien vermuten lassen.

3.1.3 Sieben-Tage-alte Pflanzen vom Wildtyp-Tabak

3.1.3.1 Transkription in den Chloroplasten vom sieben-Tage-alten Wildtyp-Tabak

Um zu bestimmen, ob Blattseneszenz Voraussetzung für die beobachtete Antwort der plastidären Genexpression auf die Cytokininbehandlung ist, wurden *run-on*-Experimente mit

RNAs, isoliert aus Chloroplasten von Blättern sieben-Tage-alter Tabakpflanzen 15, 30, 60, 120 und 180 min nach Behandlung mit BA, durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit seneszenten Tabakblättern, erfolgte die transkriptionelle Aktivierung aller getesteten plastidären Gene bereits 120 min nach Cytokininbehandlung (Abbildung 3.5; Säulen in lila). Dies deutet darauf hin, dass das Antwortzeitfenster auf exogen zugeführtes Cytokinin in der Tat vom Entwicklungsstatus der Blätter und womöglich ihrer Chloroplasten abhängig ist. Für die Mehrheit der Gene konnte weder zum Zeitpunkt davor (15, 30, 60 min) noch danach (180 min) ein Cytokinineffekt auf die Transkription festgestellt werden. So folgte der Aktivierung nach 180 min unter Cytokinineinfluss bei der Mehrheit der Gene die Angleichung der Synthese an die in der Kontrolle. Die Ausnahmen mit einer kurzzeitigen Abnahme der Transkription (*atpH*, *accD*, *rpoB*, *petB*, *petD*) bzw. früheren Aktivierung der Transkription durch BA (*psaC* *rps4*, *rps8*) lassen vermuten, dass Cytokinin die Transkription der Chloroplastengene differentiell beeinflusst. Dafür spricht auch das Gen *rrn16*. So zeigte sich interessanterweise das in den seneszenten Blättern durch Cytokininzugabe transkriptionell unbeeinflusste Gen *rrn16* auch in den sieben-Tage-alten Tabakpflanzen nicht responsiv gegenüber exogenem BA.

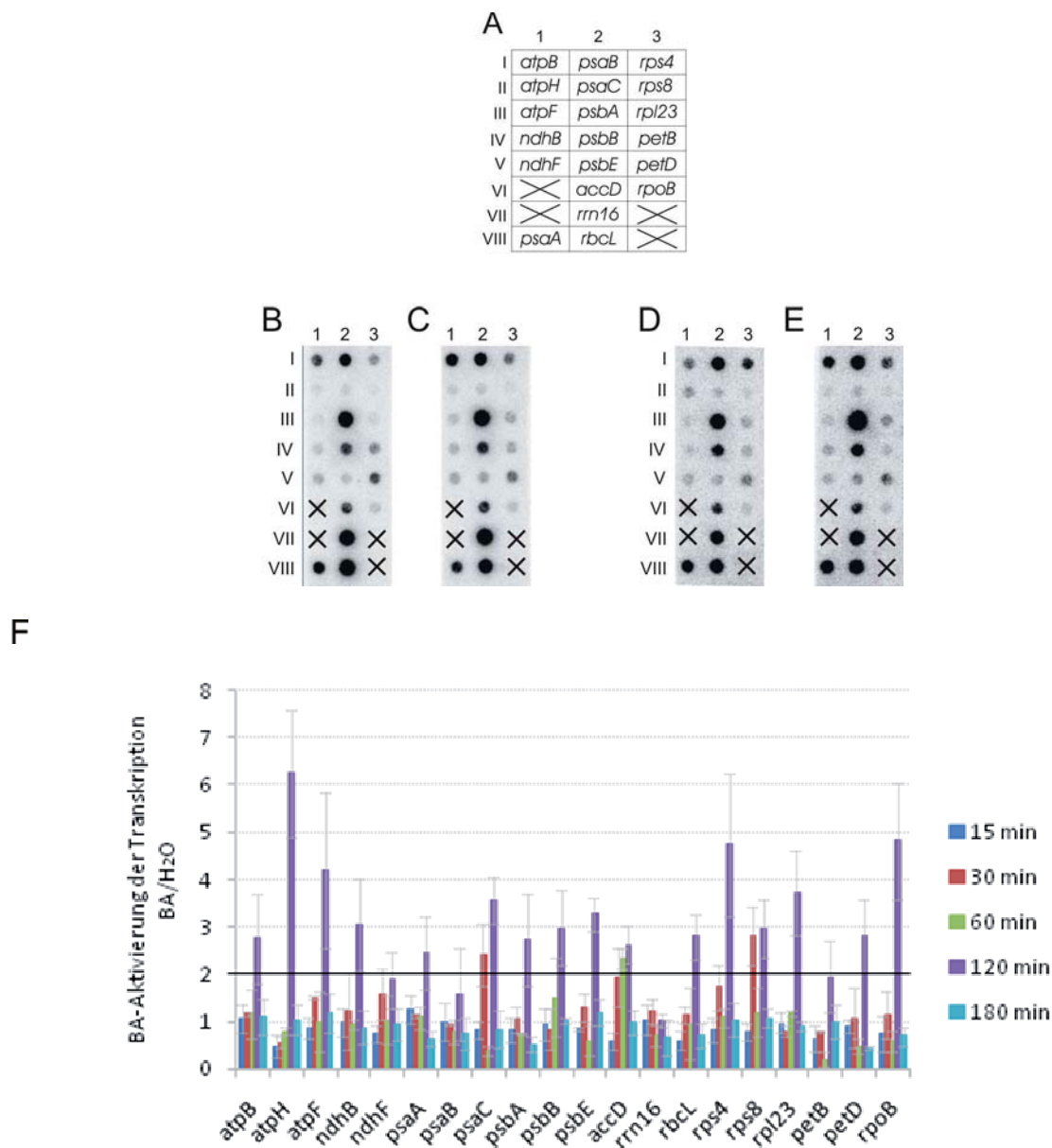


Abbildung 3.5: Cytokinineffekt auf die Transkription in Chloroplasten von sieben-Tage-alten Tabakpflanzen. Tabaksamen wurden sieben Tage in flüssigem $\frac{1}{2}$ MS-Medium angezogen, darauffolgend für 15, 30, 60, 120 und 180 min im Licht in Wasser oder BA inkubiert (siehe Kapitel 2.2.3). Chloroplasten wurden aus dem gesamten Pflanzenmaterial isoliert und 5×10^7 für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet. [32 P]-markierte Transkripte wurden isoliert und mit den zuvor nach Schema (A) auf der Nylonmembran aufgetragenen plastidären Gensonden hybridisiert. Radioaktive Signale wurden detektiert und quantifiziert wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben. (B-C) *Dot-Blot* Autoradiogramme für ausgewählte plastidäre Gene, die einen Effekt von Cytokinin auf die Transkription in Chloroplasten nach 120 min zeigen. Die Hybridisierung erfolgte mit *run-on*-Transkripten aus Chloroplasten von sieben-Tage-alten Tabakpflanzen, inkubiert in Wasser (B, D) oder BA-Lösung (C, E). B+C und D+E repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Die für die repräsentativen *Dot-Blots* gezeigten Daten können ein wenig von den Mittelwerten aus den mehrmals durchgeführten Experimenten (D) abweichen. Das Verhältnis der Transkriptionsraten in Chloroplasten aus Cytokinin-behandelten Tabakblättern zu denen in Chloroplasten aus Kontrollblättern (im Wasser) sind als Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt. Die schwarze Linie markiert den Schwellenwert ($=2,0$) für eine Aktivierung der Transkription.

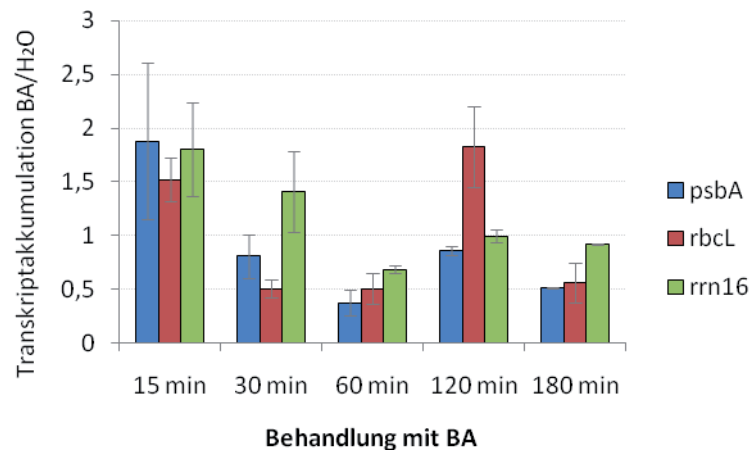
3.1.3.2 Transkriptakkumulation plastidärer Gene sowie nukleärer *RpoT*-Gene in sieben-Tage-alten Wildtyp-Tabak

Um zu untersuchen, wie sich im Vergleich zum seneszenten Tabak der Einfluss von Cytokinin auf die Transkriptstabilität in den Chloroplasten sowie die *RpoT*-Gene in den sieben-Tage-alten Tabakpflanzen widerspiegelt, wurden die Transkriptmengen von *psbA*, *rbcL*, *rrn16*, *rpoB*, *RpoTp*, *RpoTmp* sowie *RpoTm* 15, 30, 60, 120 sowie 180 min nach Cytokininzufuhr mittels quantitativer *real-time* RT-PCR bestimmt (Abbildung 3.6). Im Unterschied zu den seneszenten Tabakpflanzen (Abbildung 3.3) war ein leichter Anstieg in den Transkriptmengen der plastidären Gene 15 min nach Behandlung festzustellen (Abbildung 3.6A). Die leichte Zunahme der Transkriptakkumulation könnte auf ein sensitiveres Signalsystem gegenüber Cytokinin in den jungen Tabakpflanzen hindeuten. Es wurden jedoch keine Zeitpunkte zwischen 0 und 15 min analysiert. Alternativ könnte die früh beobachtete verringerte Transkriptakkumulation von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* in den seneszenten Tabakblättern in den jungen Pflanzen innerhalb der ersten 15 min stattgefunden haben. Wie in den seneszenten Blättern auch, kam es vor der transkriptionellen Aktivierung (Abbildung 3.5; 120. Minute) zu einer Abnahme der Transkriptmengen von *psbA*, *rbcL* und *rrn16*. Die plastidären Transkriptmengen fielen sogar deutlich unter die der Kontrollpflanzen. Zum Zeitpunkt der Induktion der Transkription (Abbildung 3.5; 120. Minute) wurden dann, wie im seneszenten Tabak auch, erneut mehr Transkripte akkumuliert. Da die Korrelation zwischen plastidärer Transkriptsynthese und Transkriptstabilität, zeitlich versetzt, sowohl in den seneszenten als auch in den jungen Tabakblättern zu beobachten ist, kann vermutet werden, dass der Mechanismus der Cytokinin-induzierten Regulation der plastidären Genexpression nach einem allgemeinen Muster abläuft - unabhängig vom physiologischen Entwicklungsstatus der Pflanze. Nach 180 min konnte erneut eine Abnahme der Transkriptakkumulation beobachtet werden. Die Transkriptmengen von *psbA* und *rbcL* waren im Vergleich zur Kontrolle sogar halbiert (Abbildung 3.6A). Gleichzeitig war auch deren Transkription und die der anderen untersuchten plastidären Gene verringert (siehe auch Abbildung 3.5; Säulen in türkis).

Im Gegensatz zu den seneszenten Blättern scheinen die Transkriptmengen von *RpoTp* und *rpoB* im jungen Entwicklungsstadium der Tabakpflanze nicht miteinander zu korrelieren. Während die *rpoB*-Transkriptmengen kurz nach BA-Zugabe (15 min) 2fach erhöht waren, kam es zu einer Halbierung der *RpoTp*-Transkriptakkumulation. Letztere stabilisierte sich im weiteren Verlauf der BA-Behandlung wieder, wohingegen für *rpoB* nach 60-minütigem BA-Einfluss weniger als die Hälfte an Transkripten gebildet wurde als in den Wasserkontrollen. Damit kam es, wie bei *psbA*, *rbcL* und *rrn16*, zu einer Transkriptinstabilität von *rpoB* vor der transkriptionellen Aktivierung der Transkription. Des Weiteren ging die gesteigerte

Transkription (Abbildung 3.5; 120. Minute) ebenfalls mit einer Stabilisierung der *rpoB*-Transkriptakkumulation einher.

A



B

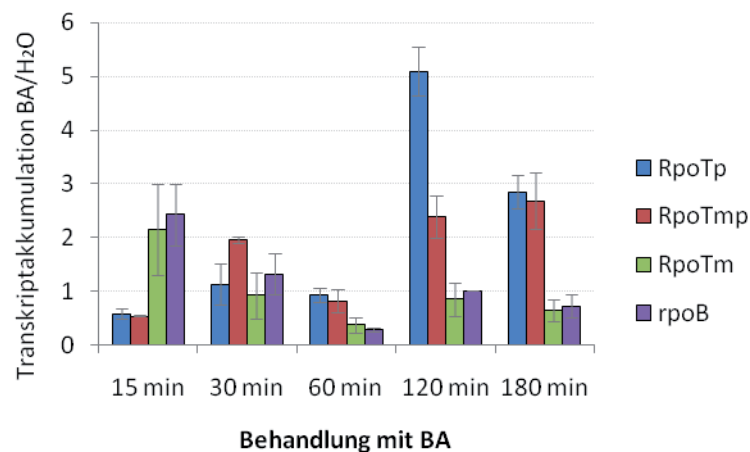


Abbildung 3.6: Cytokinineffekt auf die Transkriptakkumulation in Sieben-Tage-alte Tabakpflanzen. Die Pflanzen wurden in flüssigem $\frac{1}{2}$ MS-Medium für 7 Tage angezogen und mit Cytokinin ($5 \mu\text{M}$ BA) für 15, 30, 60, 120 und 180 min behandelt wurden. Mit der UBQ-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und sind als Verhältnis BA/ H_2O von vier unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt. (A) Transkriptakkumulation von *psbA*, *rbcL* und *rrn16*. (B) Transkriptakkumulation von *RpoTp*, *RpoTmp*, *RpoTm* sowie *rpoB*.

Interessanterweise war zu diesem Zeitpunkt eine 5fache Steigerung der *RpoTp*-Transkriptmengen zu verzeichnen, welche nach 180 min zwar geringer, aber immer noch signifikant erhöht waren. Zwar bewirkte diese Zunahme keine Steigerung der Transkriptakkumulation von *rpoB* und somit möglicherweise verstärkte Bildung von PEP, dennoch scheint es, als ob in jungen Tabakpflanzen die BA-vermittelte Induktion der plastidären Transkription in der 120. Minute (Abbildung 3.5) zumindest von der

Transkriptstabilität von *RpoTp* beeinflusst wird. Da für die sieben-Tage-alten Tabakpflanzen keine Aktivierung der *rpoB*-Transkription in der 15. Minute der BA-Behandlung detektiert werden konnte, ist sehr wahrscheinlich nicht die Transkription, sondern eine erhöhte Transkriptstabilität für den Anstieg der *rpoB*-mRNA-Mengen verantwortlich. Vielleicht wird die Induktion der Transkription neben *RpoTp* auch über die *RpoTmp*-Transkriptstabilität vermittelt. So konnte nach 120 min eine signifikante Steigerung der *RpoTmp*-Transkriptmengen über den der Kontrollen (BA/H₂O-Ratio 2,4) beobachtet werden, die auch im späteren Verlauf der BA-Behandlung erhalten blieb (BA/H₂O-Ratio 2,7).

Interessanterweise war im Gegensatz zu *RpoTp* und zur Akkumulation in den seneszenten Tabakblättern für *RpoTm* nach 15-minütiger Cytokinininkubation der jungen Tabakpflanzen eine 2fache Steigerung der Transkriptmenge zu beobachten. Bis 60 min nach BA-Behandlung nahm sie auch stetig ab. Die *RpoTm*-Transkriptakkumulation stabilisierte sich wieder nach 2h, wohingegen es in den seneszenten Blättern zu diesem Zeitpunkt zu einer 2fachen Steigerung der Transkriptmenge von *RpoTm* kam. Cytokinin scheint demnach sowohl die Transkriptionsaktivität als auch die Transkriptstabilität von Plastidengen und nukleären *RpoT*-Genen in jungen und seneszenten Tabakpflanzen abhängig vom Entwicklungszustand der Blätter und/oder Chloroplasten differenziell zu regulieren.

3.1.4 Auswirkungen der Cytokininapplikation bei cytokinindefizienten Tabakpflanzen

Cytokininoxidasen/-dehydrogenasen (CKXs) spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation von Hormonmengen in Pflanzengewebe, indem sie Cytokinine irreversibel abbauen (Kapitel 1.2.1). Werner et al. (2001) stellten transgene Tabakpflanzen mit einem reduzierten Cytokiningehalt her, in denen *CKX*-Gene aus *Arabidopsis thaliana* unter der Kontrolle eines 35S-Promotors überexprimiert werden. So sind die Konzentrationen verschiedener Cytokininmetabolite in *AtCKX2*-überexprimierenden transgenen Tabakpflanzen signifikant reduziert. Diese Cytokinindefizienz verursacht eine stark verzögerte Sprossentwicklung mit kurzen Internodien, die schließlich zu einem Zwergenwachstum führen. Das Wurzelwachstum hingegen ist verstärkt ausgeprägt.

3.1.4.1 Einfluss des endogenen Cytokiningehalts auf die Transkription

Anhand cytokinindefizienter Pflanzen sollte der Einfluss des endogenen Cytokiningehalts auf die Transkription in den Chloroplasten bestimmt werden. Die Analyse der plastidären *run-on*-Transkripte zeigte im Vergleich zum Tabak-Wildtyp für die Mehrheit der untersuchten Gene

eine um mehr als die Hälfte reduzierte Transkriptionsaktivität (Abbildung 3.7). Lediglich *petB* wies mit einer zum Wildtyp relativen Transkriptionsrate von 0,68 nur eine leichte Abnahme auf. So scheint der Cytokininmangel einen drastischen Effekt auf die allgemeine Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten hervorzurufen.

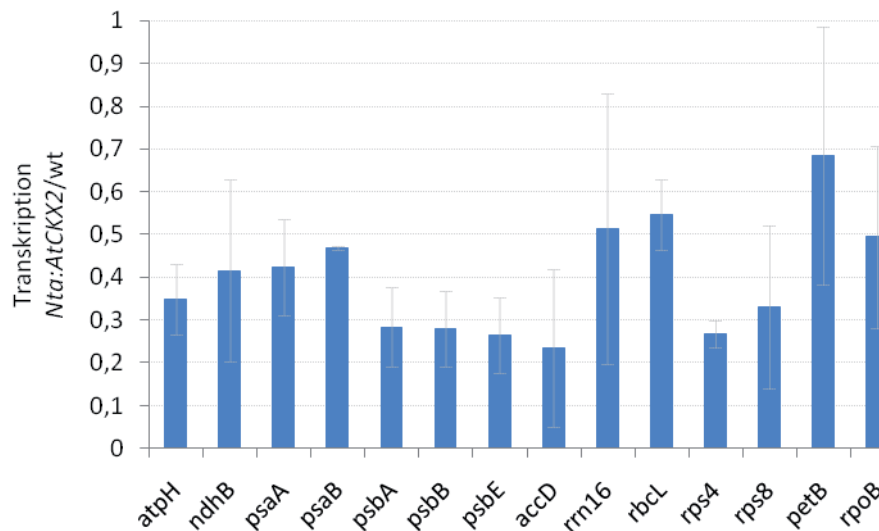


Abbildung 3.7: Einfluss des endogenen Cytokiningehalts auf die Transkription in den Chloroplasten. Vergleich der Transkriptionsaktivität der plastidären Gene zwischen Wildtyp (wt) und *Nta:AtCKX2*-Mutante. Chloroplasten aus abgeschnittenen Blättern von 12-Wochen-alten Tabakpflanzen vom Wildtyp sowie der cytokinindefizienten Tabakmutante *Nta:AtCKX2* wurden isoliert und 5×10^7 für *run-on*-Transkriptionsassays eingesetzt. Das Verhältnis der Transkriptionsraten in Chloroplasten von Wildtyp-Tabakblättern zu denen in Chloroplasten aus Blättern der cytokinindefizienten Mutante sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt.

Zur Klärung der Frage, inwieweit der endogene Cytokiningehalt den Effekt der exogenen Cytokininapplikation auf die Transkription in den Chloroplasten beeinflusst, wurden Blätter von 12-Wochen-alten *Nta:AtCKX2*-Pflanzen nach einer 24h-Prä-Inkubation in Wasser und konstantem Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) für 15, 30, 60, 120 und 180 min in Wasser bzw. BA unter den gleichen Lichtbedingungen inkubiert und die aus den Chloroplasten isolierten RNAs für *run-on*-Transkriptionsassays eingesetzt. Wie bei den seneszenten Tabakblättern (Abbildung 3.2) konnte auch in diesem Fall, mit Ausnahme von *psbE* (1,8) und *rbcL* (0,9), im Vergleich zur Wasserkontrolle eine deutliche Runterregulierung der *run-on*-Transkriptmengen 15 min nach BA-Zugabe beobachtet werden (Abbildung 3.8).

Im Vergleich zu den seneszenten Blättern, wo eine Induktion der Transkription nach 180 min zu beobachten war (Abbildung 3.2), erfolgte die Induktion der plastidären Gene durch exogenes Cytokinin zu einem früheren Zeitpunkt. So waren bereits 30 min nach BA-Zugabe *atpH*, *ndhB*, *accD*, *rrn16*, *rbcL*, *rps4*, *rps8*, *psbB* und *rpoB* um mehr als das Doppelte

hochreguliert. Überraschend hierbei ist, dass im Gegensatz zum seneszenten Tabak-Wildtyp *rrn16* durch BA scheinbar induziert wird. Des Weiteren wurde eine nahezu 2fache Steigerung der Transkriptionsaktivität für die Gene *psaA*, *psaB* und *psbA* detektiert. Die *petB*-Transkriptsynthese nahm im Vergleich zum 15 min-Wert ebenfalls zu und stabilisierte sich (BA/H₂O-Ratio von 1,0). Auch das bereits früh induzierte *psbE*-Gen blieb nach 30 min BA-Inkubation in seiner Transkription erhöht (BA/H₂O-Ratio von 1,8). Interessanterweise war gerade zu diesem Zeitpunkt die Transkription in den BA-behandelten, seneszenten Wildtyp-Tabakblättern auf mindestens die Hälfte reduziert (Abbildung 3.2; 30 min). Möglicherweise führt der reduzierte Cytokiningehalt in der *Nta:AtCKX2*-Mutante zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber exogenem Cytokinin und kompensiert so den niedrigen endogenen Cytokiningehalt.

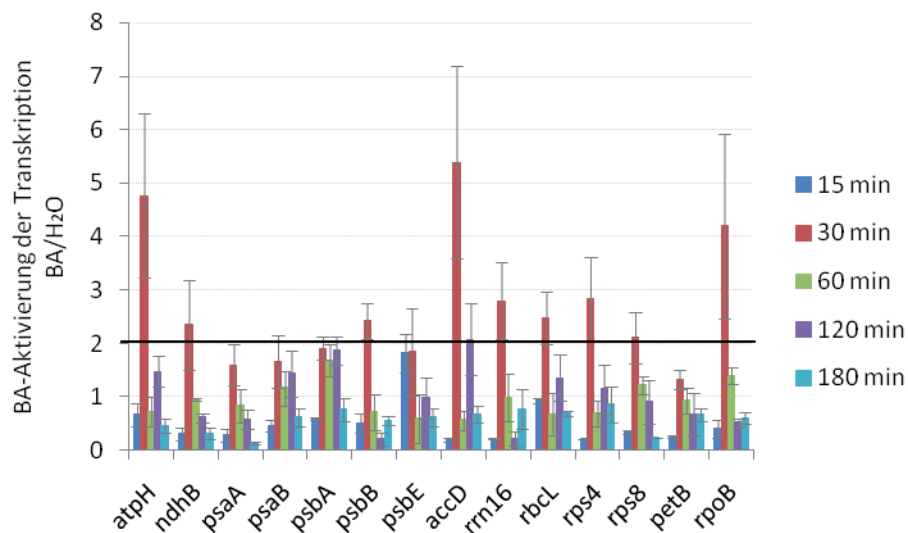


Abbildung 3.8: Cytokininfluss auf die Transkription in Chloroplasten von cytokinindefizienten Tabakpflanzen im Starklicht. Abgeschnittene Blätter von 12-Wochen-alten Tabakmutanten (*Nta:AtCKX2*) wurden für 24 h in Wasser unter konstantem Licht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) prä-inkubiert, dann für 15, 30, 60, 120 und 180 min im Licht in Wasser oder BAP inkubiert. Chloroplasten wurden aus dem gesamten Blattmaterial isoliert und 5×10^7 für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet. Das Verhältnis der Transkriptionsraten in Chloroplasten aus Cytokinin-behandelten Tabakblättern zu denen in Chloroplasten aus Kontrollblättern (im Wasser) sind als Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt. Die schwarze Linie markiert den Schwellenwert ($=2,0$) für eine Aktivierung der Transkription.

Anschließend sanken die Transkriptionsaktivitäten der getesteten Gene nach 60-minütiger BA-Applikation wieder auf die Werte der Wasserkontrollen, um dann nach 120- bis 180-minütiger Inkubation noch weiter abzunehmen. Nur *psbA* blieb auch später im Zeitverlauf hochreguliert. Erst nach 180 min wurde hier eine Normalisierung auf die Kontrollwerte beobachtet. Weiterhin kam es für *accD* nach 120 min nochmals zu einer 2fachen Steigerung

der Transkriptsynthese, gefolgt von einer erneuten Abnahme der *run-on*-Transkriptmenge in der 180. Minute der BA-Behandlung, die unter der der Kontrollen lag.

Die beobachtete Induktion der plastidären Gene 30 min nach Cytokininapplikation führte zu der Frage, ob BA in der Tat die Chloroplastentranskription in den *Nta:AtCKX2*-Tabakpflanzen stimuliert, um so höhere Aktivitäten zu erreichen oder ob die Seneszenz-induzierte Abnahme der Transkription, die möglicherweise nach dem Abschneiden der Blätter auftritt, ausgeglichen wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Transkription in den Chloroplasten sofort nach dem Abschneiden der Blätter (0h) sowie nach den (Prä-) Inkubationszeiten von 24h+15min, 24h+30min, 24h+60min, 24h+120min und 24h+180min in Wasser oder BA unter Starklicht untersucht (Abbildung 3.9). Während die Transkription des *rps8*-Gens im Laufe der Inkubation in Wasser keine signifikanten Veränderungen aufwies, resultierte die 24h-Prä-Inkubation in Wasser tatsächlich in einen deutlichen Abfall der Transkriptionsaktivität aller anderen getesteten Gene (24h+15min). Die Aktivität erhöhte sich wieder bis zur 120. Minute (*psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbE*, *accD*, *rbcL*, *rrn16*, *atpH*, *ndhB*, *psbB*, *rps4*, *petB* und *rpoB*) oder sogar bis zur 180. Minute (*psaA*, *psaB*, *accD*, *atpH*, *ndhB*, *psbB* und *petB*). Nur für *psbE* wurde bereits nach 30 min und für *psbB* nach 60 min eine kurzzeitige Abnahme detektiert.

Die Zunahme der Transkription in den ersten zwei Stunden in der BA-unbehandelten *Nta:AtCKX2*-Mutante korrespondiert mit der gesteigerten Transkription der Chloroplastengene in den seneszenten Wildtyp-Tabakblättern (Abbildung 3.1). Die Inkubation im Wasser und Starklicht stellt für die Chloroplasten eine Stresssituation dar. Möglicherweise verursachen deshalb die hier durchgeführten Versuchsbedingungen für einen kurzen Zeitraum einen Anstieg des endogenen Cytokiningehalts in den abgeschnittenen Tabakblättern, der wiederum die Transkription in den Chloroplasten kurzzeitig induziert (siehe auch Kapitel 3.1.2.1). Nach 3h Prä-Inkubation funktionierte das sogenannte Stressabwehrprogramm nicht mehr. Aus diesem Grund kam es zu einer deutlichen Abnahme der Transkriptionsaktivität. So lag denn auch die Transkription nach 3h Inkubation im Wasser mit Ausnahmen von *atpH* und *ndhB* unter der in den kurz zuvor abgeschnittenen Blättern (0h). Aber auch der in Kapitel 3.1.2.1 erwähnte Einfluss der circadianen Uhr auf die endogenen Cytokininkonzentrationen könnte eine Rolle spielen.

Wie noch einmal in Abbildung 3.9C+D verdeutlicht, wurde im Vergleich zur Transkriptionsrate nach 24h-Prä-Inkubation in Wasser (24h+15min) nach 30-minütiger Inkubation in BA-Lösung bei der Mehrheit der untersuchten Gene die Transkription aktiviert. Bei der oben angenommenen Induktion der Transkription von *psbE* handelt es sich jedoch in

Wirklichkeit nicht um einen positiven Effekt von BA auf die Transkriptionsaktivität. So lag die Transkriptionsaktivität trotz BA-Zugabe sowohl unter dem 15 min- als auch dem 0h-Wert.

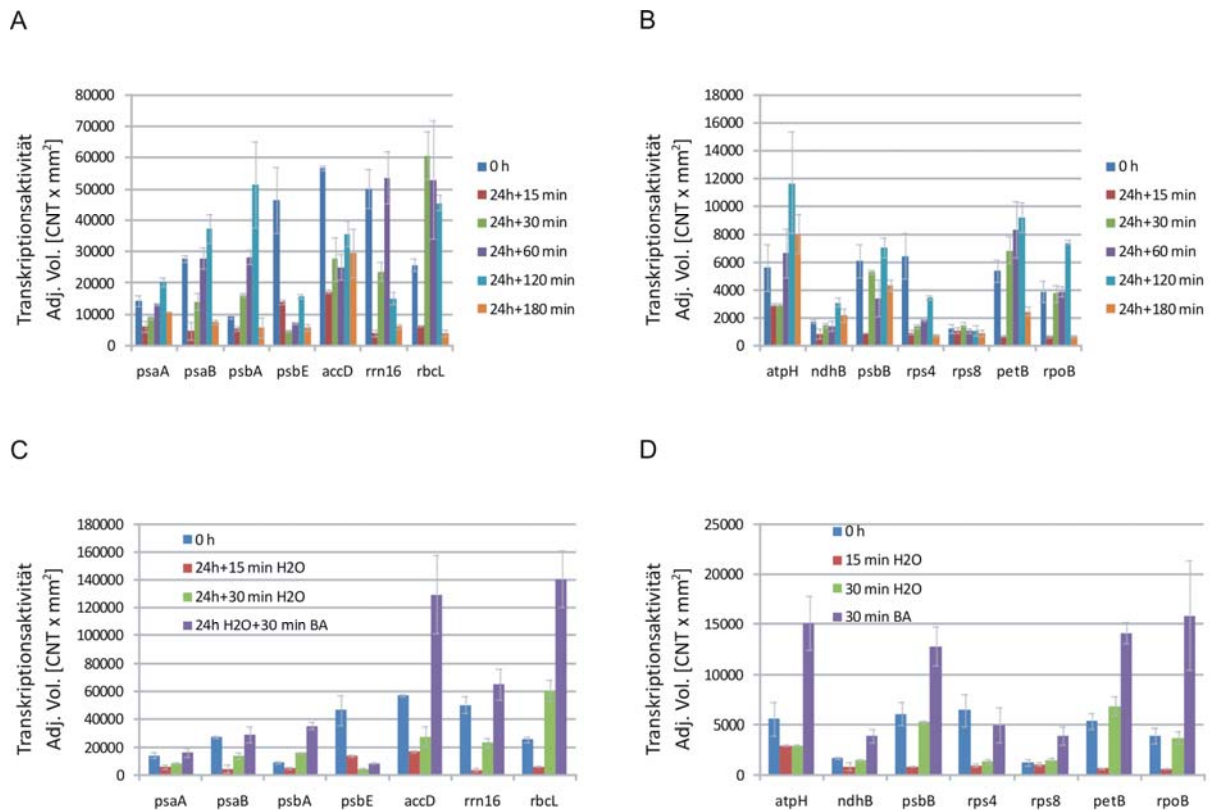


Abbildung 3.9: Effekt der Prä-Inkubation der *Nta:AtCKX2*-Blätter in Wasser im Starklicht. Die Transkription der Chloroplastengene wurde in abgeschnittenen Blättern von 12-Woche-alten *Nta:AtCKX2*-Pflanzen mittels *run-on*-Assays bestimmt, (A+B) direkt nach dem Abschneiden (0h), nach 24h-Prä-Inkubation in Wasser und weiteren 15, 30, 60, 120 sowie 180 min in Wasser. (C+D) Gezeigt ist die Transkription der Chloroplastengene direkt nach dem Abschneiden (0h), nach 24h-Prä-Inkubation in Wasser und weiteren 15, 30, 30 min in Wasser (24h+15 min H₂O, 24h+30min H₂O) oder in BA (24h+30 min BA). Die (Prä-)Inkubation wurde unter konstantem Starklicht durchgeführt (270 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die hier untersuchten Gene wurden hinsichtlich ihrer Transkriptsynthesestärke und zur besseren Veranschaulichung in zwei Diagrammen dargestellt: (A+C) stark und (B+D) schwach transkribierte Gene. Gezeigt sind die Mittelwerte der Transkriptionsaktivität aus drei unabhängigen Experimenten \pm SA.

Die Transkription von *psaA*, *psaB*, *rrn16* und *rps4* war nicht signifikant durch Cytokinin erhöht, sondern die BA-Behandlung verhinderte vielmehr den offenbar Seneszenz-induzierten Abfall der Transkription. Damit relativiert sich auch die in Abbildung 3.8 beobachtete Induktion von *rrn16* durch BA. Dagegen war die Cytokinin-vermittelte Transkriptionsrate von *psbA*, *accD*, *rbcL*, *atpH*, *ndhB*, *psbB*, *rps8*, *petB* und *rpoB* höher als in den Blättern kurz nach dem Abschneiden. Demnach stimuliert BA bei einer Gruppe von Genen differentiell die Transkription, bei einer anderen Gruppe von Chloroplastengenen hingegen wirkt es der Seneszenz-induzierten Abnahme der Transkription entgegen.

3.1.4.2 Transkriptakkumulation plastidärer Gene sowie nukleärer *RpoT*-Gene in *Nta:AtCKX2*-Blättern

Um zu analysieren, ob der reduzierte Cytokiningehalt in den *Nta:AtCKX2*-Tabakpflanzen im Vergleich zu den seneszenten Tabakblättern zu veränderten Cytokinineffekten auf die Transkriptakkumulation plastidärer Gene sowie der Kerngene des plastidären Genexpressionsapparates führte, wurden erneut die Transkriptmengen von *psbA*, *rbcL*, *rrn16*, *rpoB* sowie die kernkodierten *RpoT*-Gene in den *Nta:AtCKX2*-Tabakblättern 15, 30, 60, 120 sowie 180 min nach Cytokininapplikation analysiert. Zuerst wurde jedoch auch hier untersucht, ob der reduzierte endogene Cytokiningehalt in *Nta:AtCKX2* die mRNA-Akkumulation der plastidären Gene beeinflusste (Abbildung 3.10A). Und in der Tat waren die Transkriptmengen, bis auf *rrn16*, in den cytokinindefizienten Tabakblättern verringert, wenn auch nicht so deutlich wie auf Transkriptionsebene (siehe auch Abbildung 3.7). Auch die *RpoT*-Gene waren in den *AtCKX2*-überexprimierenden Tabakblättern von der verminderten endogenen Cytokininmenge beeinflusst (Abbildung 3.10B). Verglichen mit dem Wildtyp, waren die mRNA-Mengen von *RpoTm* nahezu auf die Hälfte und von *RpoTp* sogar um mehr als die Hälfte ihrer Transkriptmengen gefallen. *RpoTnp* hingegen zeigte, wie die plastidären Gene, nur eine leichte Verringerung der Transkriptmengen.

Im Gegensatz zu den seneszenten Wildtyp-Tabakblättern, kam es vor der transkriptionellen Aktivierung der plastidären Gene durch BA zu keiner Abnahme der Transkriptmengen in der *Nta:AtCKX2*-Mutante (Abbildung 3.10C). Im Gegenteil, *psbA* und *rbcL* zeigten 15 min nach der BA-Inkubation sogar einen leichten Anstieg ihrer Transkriptmengen. Aber vielleicht reagierten die Chloroplasten in diesen transgenen Blättern aufgrund der vom reduzierten Cytokiningehalt ausgelösten erhöhten Sensitivität gegenüber BA bezüglich Änderungen von Transkriptmengen schneller als die vom Tabak-Wildtyp. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass zwischen dem Zeitraum von 15 min bis 30 min doch eine Verringerung der plastidären Transkriptmengen stattgefunden hat. Trotz der erhöhten plastidären Transkriptionsaktivität in der 30. Minute der BA-Behandlung fielen zu diesem Zeitpunkt die *psbA*- und *rbcL*-Transkriptmengen auf mehr als die Hälfte der in den Kontrollen beobachteten Werte. Möglicherweise ist das Aufrechterhalten der Transkriptstabilität in diesen transgenen Pflanzen gestört. Stattdessen war erst nach 60 min eine leichte Zunahme der Transkriptmengen zu verzeichnen. Nach 2h fielen die Mengen sogar auf eine BA/H₂O-Ratio von 0,2, um sich dann nach 3h wieder zu stabilisieren (1,0). Im Gegensatz dazu sowie zu den seneszenten Wildtyp-Tabakblättern (Abbildung 3.3) blieben die Transkriptmengen von *rrn16* mehr oder weniger von der BA-Applikation unbeeinflusst. Möglicherweise bewirkt der

reduzierte interne Cytokiningehalt in der *Nta:AtCKX2*-Mutante als Antwort auf exogenes Cytokinin differentielle Unterschiede in der plastidären Transkriptstabilität.

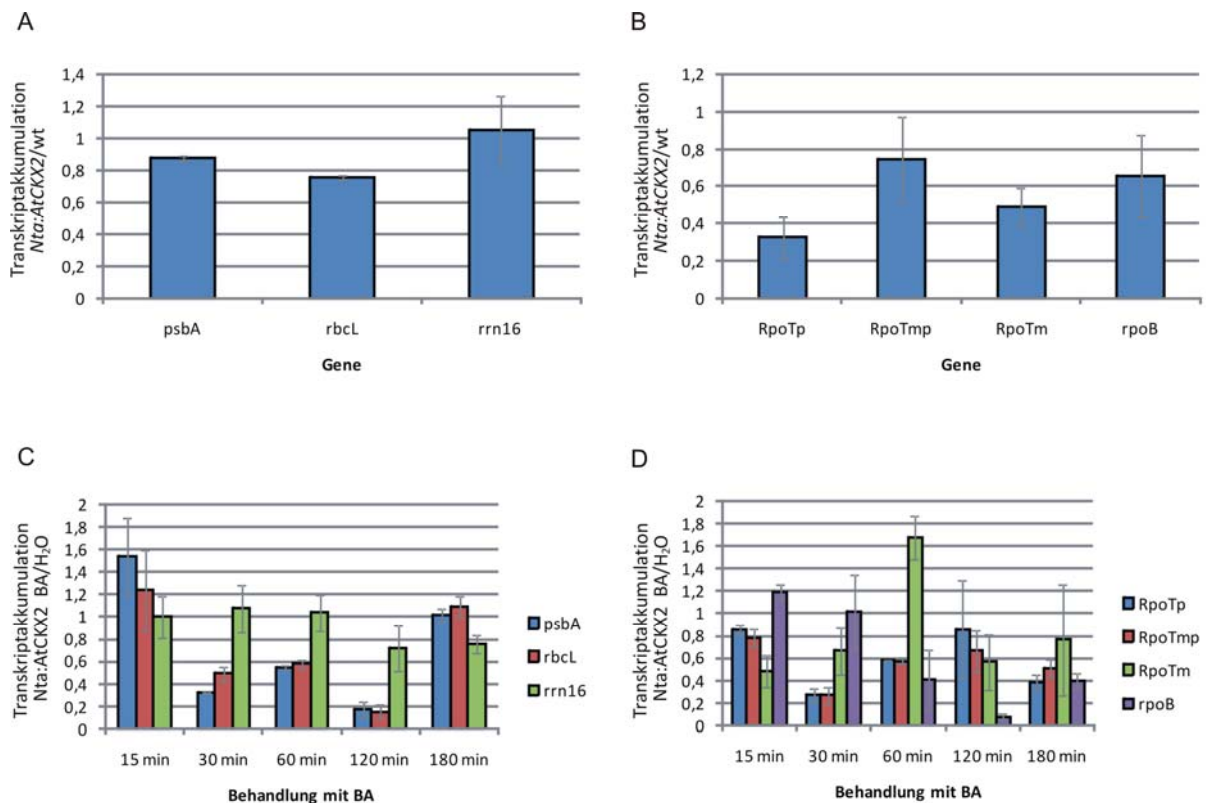


Abbildung 3.10: Transkriptakkumulation in den Chloroplasten der Tabakmutante *Nta:AtCKX2*. Einfluss des endogenen Cytokiningehalts auf die mRNA-Mengen von (A) *psbA*, *rbcl*, *rrn16* sowie (B) *rpoB*, *RpoTp*, *RpoTmp* und *RpoTm* in unbehandelten Blättern vom Tabak-Wildtyp und *Nta:AtCKX2*. (C+D) Cytokininereffekt auf die Transkriptakkumulation von *psbA*, *rbcl* und *rrn16* sowie *rpoB*, *RpoTp*, *RpoTmp* und *RpoTm*. Abgeschnittene Blätter der cytokinindefizienten Tabakmutante *Nta:AtCKX2* wurden in Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) für 24 h prä-inkubiert, dann mit Cytokinin ($5 \mu\text{M}$ BA) für 15, 30, 60, 120 und 180 min behandelt. Mit der UBQ-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und sind als Verhältnis BA/H₂O von drei unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt.

Im Unterschied zu *rpoB* in den seneszenten Tabakblättern wies die *rpoB*-Transkriptmenge nach 15 min BA-Applikation eine leicht erhöhte Akkumulation auf (Abbildung 3.10D). Weiterhin glich zum Zeitpunkt der transkriptionellen Aktivierung von *rpoB* (30. Minute) die Transkriptakkumulation der in den Kontrollen. Schließlich sank die mRNA-Menge von *rpoB* 2h nach Cytokininbehandlung auf ein Zehntel der in den unbehandelten Blättern und zeigte nach 3h immer noch eine signifikante Transkriptinstabilität (0,4). Die mRNA-Mengen von *RpoTp*, *RpoTmp* und *RpoTm* waren 15 min nach BA-Zufuhr verringert, letzteres mit einer BA/H₂O-Ratio von 0,5 sogar signifikant. Im genauen Vergleich mit dem seneszenten Wildtyp-Tabak scheint es so, als ob die Schwankungen in den *RpoT*-Transkriptmengen in den BA-behandelten cytokinindefizienten Blättern in dem hier untersuchten Zeitraum um einen

Zeitpunkt nach vorn verschoben sind. Vor dem Hintergrund der Aufrechterhaltung der Homöostase lässt diese Beobachtung auf ein im Vergleich zum Wildtyp-Tabak schnelleres *turnover* mit einer erhöhten Abbaurrate von Transkripten in den Cytokinin-behandelten transgenen Blättern schließen. Im Unterschied zu *RpoTp* und *RpoTmp* zeigte *RpoTm* nach anfänglichem BA-vermittelten Abfall seiner mRNA-Menge eine leicht erhöhte Transkriptakkumulation in der 60. Minute (BA/H₂O-Ratio von 1,7). Im Wildtyp-Tabak wurde dagegen erst nach 180 min der BA-Inkubation ein Anstieg verzeichnet (Abbildung 3.4). Im weiteren Verlauf nahmen die *RpoTm*-Transkriptmengen in der *Nta:AtCKX2*-Mutante ab, womöglich um so wieder normale mRNA-Mengen zu erreichen. Zusammengefasst beeinflusst der endogene Cytokiningehalt offensichtlich die Transkription und die Transkriptstabilität durch exogenes BA. Dabei scheint aufgrund der reduzierten endogenen Cytokininmengen die Transkriptstabilität in der BA-behandelten *Nta:AtCKX2*-Mutante verringert zu sein.

3.2 Auswirkungen der Cytokininapplikation bei sieben-Tage-alten Wildtyp- und cytokinindefizienten Arabidopsis-Pflanzen

3.2.1 Transkription in Chloroplasten von sieben-Tage-alten Wildtyp-Arabidopsis

Im Gegensatz zur Gerste (Zubo et al., 2008) konnte die Chloroplastentranskription auch in Blättern von jungen Tabakpflanzen durch Cytokinin aktiviert werden (siehe Abbildung 3.5). Um zu analysieren, ob dies ein ubiquitäres Merkmal unter den dikotylen Pflanzen ist, wurden die Untersuchungen auf Arabidopsis ausgeweitet. Tatsächlich zeigten die *run-on*-Experimente mit Chloroplasten von sieben-Tage-alten Arabidopsis-Pflanzen eine Aktivierung der plastidären Transkription nach 120-minütigem BA-Einfluss (Abbildung 3.11; rote Balken). So wurde für *atpB*, *psbA* und *rrn16* eine 2fache, für *petB* and *petD* ein 3fache, im Fall von *rps8* sogar eine über 4fache Steigerung der Transkriptionsaktivität detektiert. Interessanterweise erfolgte die Induktion der Transkription von *rrn16* in den sieben-Tage-alten Tabakpflanzen nicht durch Cytokinin (Abbildung 3.5).

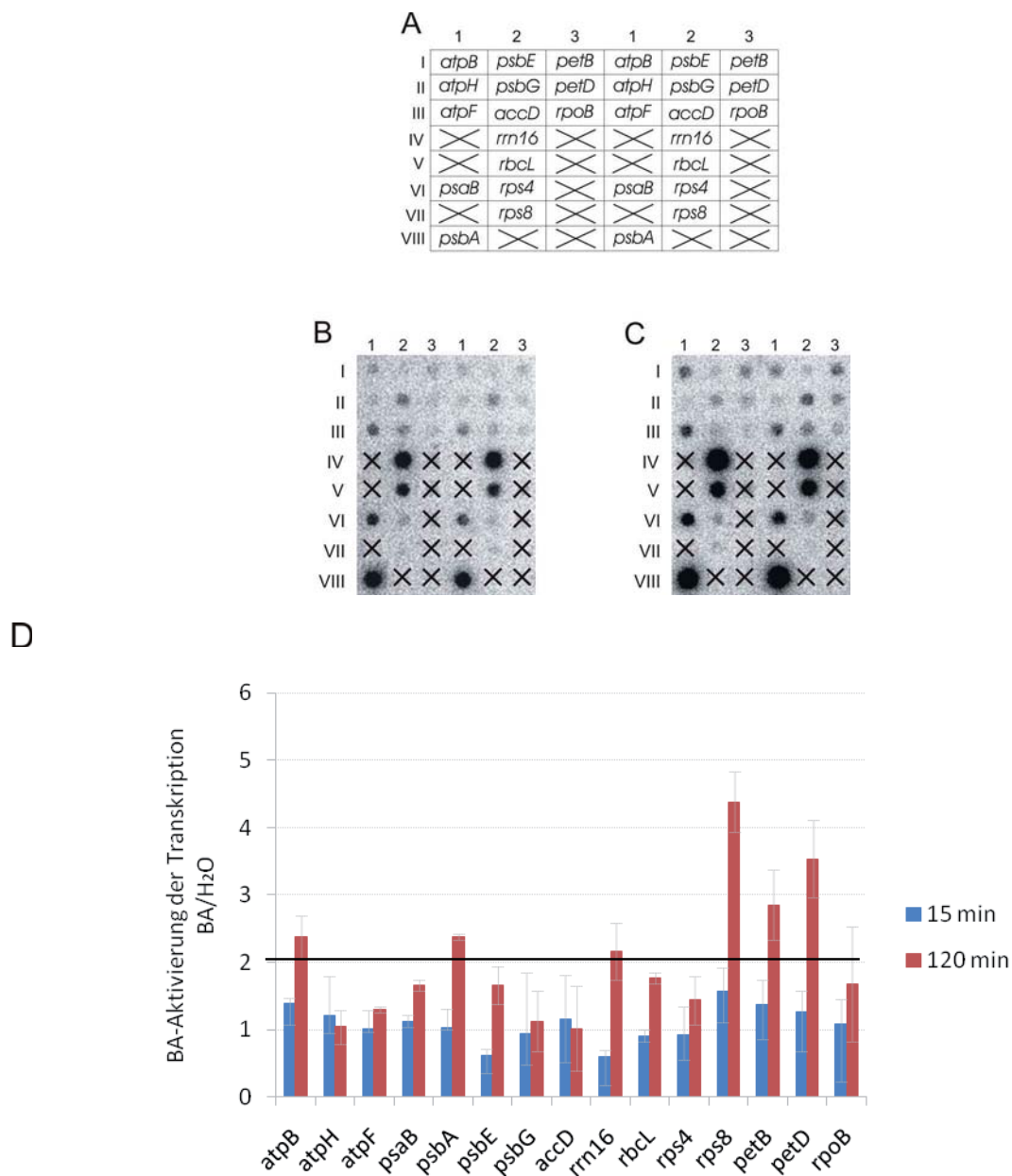


Abbildung 3.11: Cytokinineffekt auf die Transkription in Chloroplasten von sieben-Tage-alten Wildtyp-Arabidopsis. Samen wurden für 7 Tage in flüssigem $\frac{1}{2}$ MS-Medium angezogen darauffolgend für 15, 30, 60, 120 und 180 min im Licht in Wasser oder BA inkubiert (siehe Kapitel 2.2.3). Chloroplasten wurden aus dem gesamten Pflanzenmaterial isoliert und für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet. [32 P]-markierte Transkripte wurden isoliert und mit den auf der Nylonmembran aufgetragenen plastidären Gensonden hybridisiert (A). Radioaktive Signale wurden detektiert und quantifiziert wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben. (B-C) *Dot-Blot* Autoradiogramme für ausgewählte plastidäre Gene, die einen Effekt von Cytokinin auf die Transkription in Chloroplasten nach 120 min zeigen. Die Hybridisierung erfolgte mit *run-on*-Transkripten aus Chloroplasten von sieben-Tage-alten Tabakpflanzen, inkubiert in Wasser (B) oder BA-Lösung (C). Die für die repräsentativen *Dot-Blots* gezeigten Daten können ein wenig von den Mittelwerten aus den mehrmals durchgeführten Experimenten (D) abweichen. Das Verhältnis der Transkriptionsraten in Chloroplasten aus Cytokinin-behandelten Tabakblättern zu denen in Chloroplasten aus Kontrollblättern (im Wasser) sind als Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt. Die schwarze Linie markiert den Schwellenwert ($=2,0$) für eine Aktivierung der Transkription.

Folglich scheint es unter den Dikotylen (Arabidopsis und Tabak) genspezifische Unterschiede in der BA-vermittelten Induktion der Transkription zu geben. Eine leichte Zunahme der

Transkriptionsaktivität war aber auch für *psaB*, *psbE*, *rbcL* und *rps4* zu beobachten, wohingegen für *atpH*, *atpF*, *psbG* sowie *accD* keine transkriptionelle Aktivierung festgestellt werden konnte. Das deutet auf eine differentielle Regulation der Transkription durch BA. Nach 15 min wurde, wie auch in den jungen Tabakpflanzen, kein signifikanter Cytokinineffekt auf Transkriptionsebene beobachtet. Vielmehr war zu diesem Zeitpunkt der BA-Behandlung ein leicht negativer Effekt auf die Transkription zu erkennen (*psbE*, *rrn16* und *rpoB*). Demnach scheint das Antwortzeitfenster auf exogenes Cytokinin nicht artspezifisch, sondern abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze zu sein.

3.2.2 Transkriptakkumulation in den Chloroplasten in sieben-Tage-alten Wildtyp-Arabidopsis

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Expression der Komponenten des plastidären Transkriptionsapparates und des Cytokinineffekts auf die Chloroplastentranskription zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der Transkriptmengen von *psbA*, *rbcL*, *rrn16* sowie *RpoTp*, *RpoTmp*, *RpoTm* und *rpoB* 15, 30, 60, 120, und 180 min nach Cytokininbehandlung (Abbildung 3.12). Ebenfalls geklärt sollten damit die Fragestellungen, ob in den sieben-Tage-alten Arabidopsis-Pflanzen, wie im jungen Tabak, eine frühe Cytokinin-vermittelte Transkriptstabilität der Plastidengene stattfindet und ob der transkriptionellen Aktivierung eine Abnahme der plastidären Transkripte vorausgeht.

Verglichen mit den Wasserkontrollen waren die *psbA*-, *rbcL*- und *rrn16*-Transkriptmengen 15 min nach BA-Zufuhr auf das Doppelte gesteigert (Abbildung 3.12A). Bis zur 60. Minute der BA-Behandlung nahmen sie in den BA-behandelten Pflanzen wieder ab, wobei nach 30 min für *rrn16* immer noch eine 2fach erhöhte Transkriptmenge detektierbar war. Im Unterschied zu den jungen Tabakpflanzen, wo die *RpoTp*- und *RpoTmp*-Transkriptmengen verringert waren (Abbildung 3.6), wiesen sie nach 15 min in Arabidopsis mit einem BA/H₂O-Verhältnis von 1,5 bzw. 2,0 eine erhöhte Transkriptstabilität auf (Abbildung 3.12C). Des Weiteren war *rpoB* in Tabak 2fach, in Arabidopsis jedoch mit 1,2 nur leicht erhöht. Während sich die *RpoTmp*-mRNA-Akkumulation nach 30 min stabilisierte (BA/H₂O-Ratio von 1,0), konnte für *RpoTp* ein 2facher und für *rpoB* ein 1,7facher Anstieg im Transkriptlevel festgestellt werden. Nach 60 min fielen deren mRNA-Mengen sowie die von *RpoTmp* und *RpoTm* zurück auf oder unter die in den unbehandelten Pflanzen detektierten Mengen. So war die im jungen Tabak vor der transkriptionellen Aktivierung beobachtete Abnahme der Transkriptakkumulation (Abbildung 3.11) ebenfalls in Arabidopsis zu verzeichnen, wenn auch für *psbA*, *rbcL* und *rrn16* deutlich geringer. Die durch BA vermittelte

erhöhte Transkriptionsaktivität in der 120. Minute (Abbildung 3.11) bewirkte keine weitere Steigerung der *psbA*-, *rbcL*- und *rrn16*-Transkripte (Abbildung 3.12A). Im weiteren Verlauf der Cytokinininkubation stabilisierten sie sich vielmehr (BA/H₂O-Ratios um 1,0). Dagegen stiegen nach 120 min die Transkriptmengen für alle drei *RpoT*-Gene sowie für *rpoB* (siehe auch junger Tabak in Abbildung 3.6B). Nach dreistündiger BA-Inkubation scheinen sich die Transkriptmengen zu normalisieren. Für *RpoTmp* kam es erneut zu einer Halbierung der mRNA-Akkumulation.

Die nach 2h erhöhten *RpoTp*-Transkriptlevel sowohl in jungen Tabak- als auch Arabidopsis-Pflanzen führten vielleicht zu der beobachteten transkriptionellen Aktivierung der Plastidengene zu diesem Zeitpunkt. Die Unterschiede zwischen Arabidopsis und Tabak lassen auf ein für die Pflanzensart eigens angepasstes Antwortverhalten auf äußere Stimuli schließen.

Um die Rolle des endogenen Cytokiningehalts auf den Effekt von exogenem Cytokinin auf die Genexpression in den Chloroplasten von Arabidopsis zu bestimmen, wurden Änderungen in den mRNA-Mengen von transgenen Pflanzen mit konstitutiver Cytokinindefizienz untersucht (*Ath:CKX2*, Werner et al., 2003). Die kurzzeitige BA-Behandlung führte im sieben-Tage-alten Arabidopsis-Wildtyp und in der *Ath:CKX2*-Mutante zu den gleichen BA-vermittelten Änderungen der *RpoT*-Transkriptmengen. Demgemäß bewirkt der reduzierte Cytokiningehalt in den *Ath:CKX2*-Pflanzen keine signifikante Änderung in der Cytokininantwort bezüglich der Transkriptakkumulation von Kerngenen. In dieser Hinsicht ähneln sich die sieben-Tage-alten *Ath:CKX2*-Pflanzen und die seneszenten *Nta:AtCKX2*-Tabakmutanten.

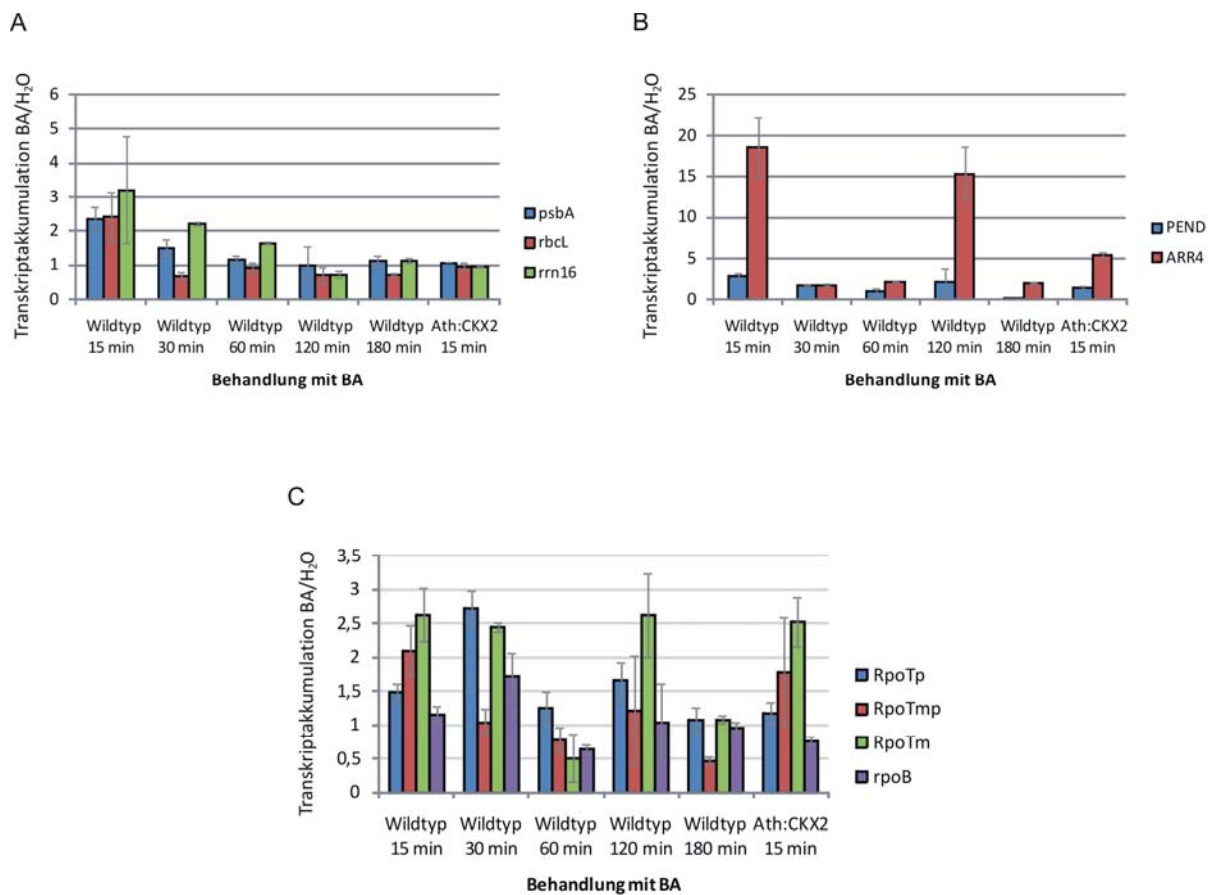


Abbildung 3.12: Cytokineffekt auf die Transkriptakkumulation in sieben-Tage-alten Wildtyp-Arabidopsis und *Ath:CKX2*-Mutanten. Die Pflanzen wurden in flüssigem $\frac{1}{2}$ MS-Medium für 7 Tage angezogen und mit Cytokinin ($5 \mu\text{M}$ BA) für 15, 30, 60, 120 und 180 min behandelt. Mit der UBQ-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und sind als Verhältnis BA/H₂O von zwei unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt. (A) plastidäre Gene *psbA*, *rbcL* und *rrn16*, (B) nukleäre Gene *PEND* und *ARR4*, (C) *RpoTp*, *RpoTm* und *rpoB*.

Abweichungen zwischen Wildtyp und Mutante wurden bezüglich der Transkriptakkumulation in den Chloroplasten festgestellt. Während im Wildtyp die plastidären mRNA-Mengen von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* um das 2fache anstiegen, blieben sie in den *Ath:CKX2*-Pflanzen unter Cytokineinfluss unverändert. Auch für *rpoB* konnte im Unterschied zum Wildtyp eine leichte Transkriptinstabilität beobachtet werden, was womöglich für eingeschränkte Signaltransduktionswege und/oder runterregulierte putative Chloroplastenrezeptoren in den Pflanzen mit konstitutiver Cytokinindefizienz hinweisen könnte.

Um erste Hinweise auf einen Einfluss von Cytokinin-regulierten (putativen) Transkriptionsfaktoren auf die Chloroplastentranskription zu bekommen, wurden die Untersuchungen auf die zwei weiteren nukleären Gene *ARR4* und *PEND* ausgeweitet (Abbildung 3.12B). Der *response regulator* aus *Arabidopsis* *ARR4* ist als Repressor der Transkription in die Cytokinin-signaltransduktion involviert (Osakabe et al., 2002) und dient als Reporter über den Cytokininstatus in Pflanzenzellen (Brenner et al., 2005). Damit konsistent ist die mRNA-Menge von *AAR4* während der Cytokininbehandlung stark hoch

reguliert. Die Induktion war auch in der *Ath:CKX2*-Mutante zu beobachten. So konnte eine im Vergleich zum Wildtyp geringere, aber dennoch über 6fach höhere Transkriptmenge von *ARR4* als in der Wasserkontrolle detektiert werden. Das deutet darauf hin, dass das von außen zugefügte Cytokinin perzipiert wurde und das regulatorische Netzwerk innerhalb der Zellen auf den exogenen Stimulus reagierte. Das PEND-Protein (*plastid envelope DNA binding*) ist ein bZIP-Motiv-enthaltenes DNA-Bindeprotein. Von dem Protein wird angenommen, dass es das Plastom an die innere Membran anheftet und so möglicherweise in die Regulation der plastidären Genexpression involviert ist (Sato et al., 1998; Sato und Ohta, 2001; Wycliffe et al., 2005). Interessanterweise wurde ein nahezu 3facher Anstieg der PEND-Transkripte 15 min nach Cytokininbehandlung detektiert. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von PEND an einer frühen Antwort auf Cytokinin hin. Zu einem späteren Zeitpunkt war noch einmal eine 2fache Zunahme zu verzeichnen (120 min). Da die transkriptionelle Aktivierung der Plastidengene nach 2h eintritt, ist wahrscheinlich PEND auch direkt in die Aktivierung der Chloroplastentranskription involviert.

3.3 Analyse von *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten in *Nicotiana tabacum*

Die zirkulären, plastidären Chromosomen sind dicht gepackt mit Genen. Die intergenischen Regionen umfassen einen relativ kleinen Teil des Gesamtzirkels, z.B. in Tabak 26,9%, und weisen die für eine Transkriptionsinitiation wichtigen *cis*-Elemente auf (Sugita und Sugiura, 1996). Ein besonders wichtiger Promotor ist stromaufwärts des *rpoB/C1/C2*-Operons zu finden. Die Transkription dieser Gene, die für drei (β , β' , β'') der vier *core*-Untereinheiten der plastomkodierten plastidären RNA-Polymerase (PEP) kodieren, beeinflusst möglicherweise die gesamte Transkriptionsaktivität des Plastids und somit die Chloroplastenentwicklung. Transkribiert wird der Gencluster jedoch von einer kernkodierten plastidären RNA-Polymerase (NEP, Hajdukiewicz et al., 1997). Somit nimmt der Zellkern Einfluss auf die Transkription in den Plastiden. Kartiert wurde der Promotor *in vitro* an Position -345 relativ zum *rpoB*-Startkodon. Er enthält das für einen NEP-Promotor vom Typ I typische CAT-*core*-Motiv (Liere und Börner, 2007a; Weihe und Börner, 1999). Transiente Expression von chimären *Arabidopsis*-5'-*rpoB*-Operon::GUS-Deletionskonstrukten in BY-2-Tabakzellkulturen gaben Hinweise auf stromaufwärts liegende regulatorische Regionen für die *rpoB*-Expression, deren Motive zwischen *Arabidopsis*, Tabak und Spinat konserviert sind (Inada et al., 1997). Es gibt jedoch keine Anzeichen für zusätzliche Sequenzelemente außerhalb des *core*-Promotors, die die *rpoB*-Transkription *in vitro* veränderten. Stattdessen scheint für eine effiziente *in vitro*-Transkription ein kurzer AT-reicher Promotorabschnitt (< 20 bp) ausreichend zu sein. Um die *rpoB*-Promotorstrukturen in *Nicotiana tabacum in vivo*

bezüglich der Nutzung des *rpoB*-Promotors zu charakterisieren und mögliche regulatorische *cis*-Elemente zu identifizieren, wurden in Zusammenarbeit mit Tatiana Teixeira-Schneider (HU Berlin) transplastome *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten mit chimären *rpoB*-Promotor::Reportergen-Konstrukten mit verschiedenen Sequenzabschnitten des Tabak-*rpoB*-Promotors hergestellt und analysiert.

3.3.1 Klonierungsstrategie

Für die *in vivo*-Analyse des *rpoB*-Promotors wurden Vektoren mit *rpoB*-Promotorabschnitten unterschiedlicher Länge stromaufwärts des Reportergens GUS bzw. GFP konstruiert. Diese Vektoren sind mittels biolistischer Transformation in das Chloroplastengenom von *Nicotiana tabacum* (Ökotyp *Petit Havana*) eingebracht worden. Die Transkriptionseffizienz der unterschiedlichen *rpoB*-Promotorkonstrukte wurde über die Expression des Reportergens bestimmt.

Ausgangspunkt für die Herstellung der verschiedenen Konstrukte war der Vektor pRB94, welcher ein pBluescript-Derivat ist (Ruf et al., 2001). Er enthält eine *aadA*-Kassette mit vorgeschaltetem *rrn16*-Promotor und *psbA*-Terminator (Abbildung 3.13). Die *aadA*-Kassette kodiert für das Enzym Aminoglykosid-3'-Adenyltransferase. Dieses verleiht den transplastomen Pflanzen eine Doppelresistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin, indem es die Hydroxylgruppe in der Ringstruktur der beiden Antibiotika adenyliert. Bei nicht-transplastomen Pflanzen lagert sich Spectinomycin an die 16S rRNA und behindert dadurch die Proteinsynthese. Streptomycin bindet an verschiedenen Stellen des Ribosoms und führt zu einer erhöhten Fehlerrate in der Translation.

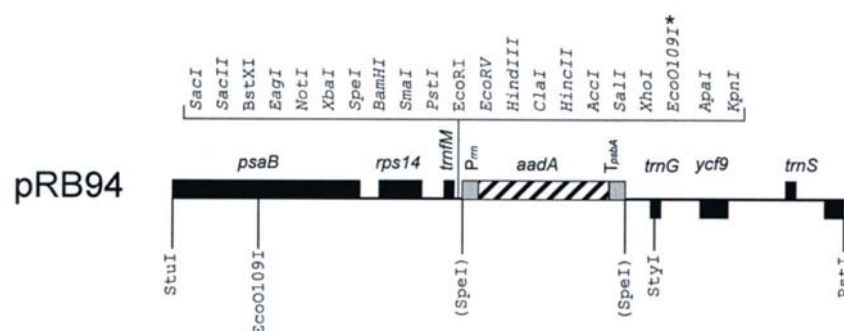


Abbildung 3.13: Karte des plastidären Transformationsvektor pRB94 (GenBank-Zugang AJ312392). Der Vektor pRB94 baut Insertionen in die plastidäre, intergenische *trnM*-*trnG*-Region ein. Das Markergen *aadA* für die Aminoglykosid-3'-Adenyltransferase erlaubt die Selektion der transformierten Pflanzen. Die multiple Klonierungsstelle MCS stammt aus pBluescript. Die plastidären Gene sind markiert als *psaB*, *rps14*, *trnM*, *trnG*, *trnS* und *ycf9*. *Prrn*, *rrn16*-Promotor; *TpsA*, *psbA*-Terminator. Nach Ruf et al. (2001).

Für die *in vivo*-Untersuchung der *rpoB*-Promotorregion wurden Plasmide generiert, indem (1) die Terminorkassette *TrbcL* (214 bp), die den Terminator des *rbcL*-Gens von *Nicotiana tabacum* kodiert, in die *PstI/XhoI*-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle von pRB94 und (2) die Reportergene GUS (1800 bp) und GFP (729 bp) stromaufwärts in die *BamHI/PstI*-Schnittstelle kloniert wurden (Abbildung 3.14).

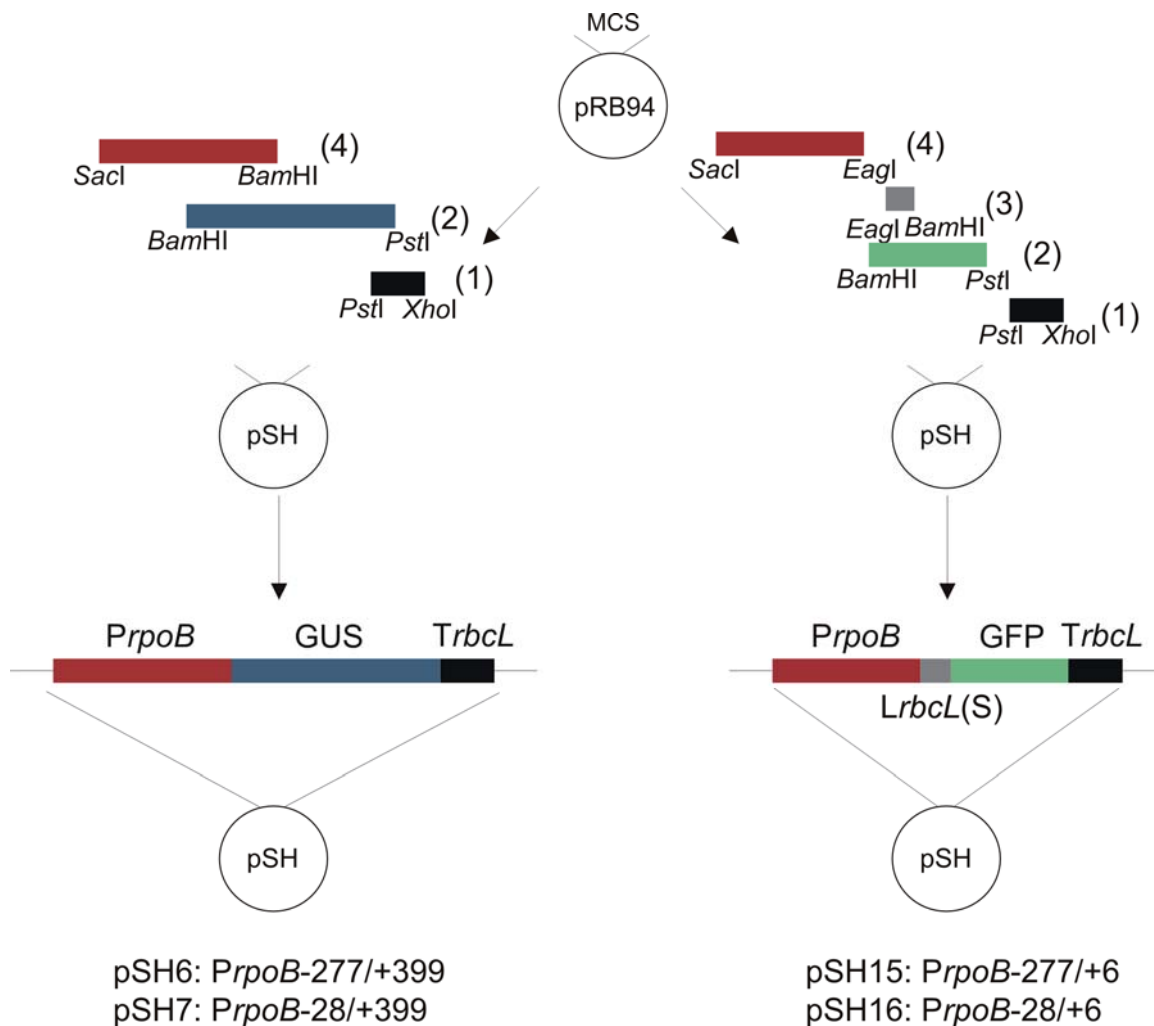


Abbildung 3.14: Klonierungsstrategie zur Gewinnung von *rpoB*-Promotor-Deletionsplasmiden für die Plastiden-Transformation in *N. tabacum*. Ausgangspunkt ist der Vektor pRB94 mit seiner multiplen Klonierungsstelle (MCS). Die Komponenten der pSH-Konstrukte sind farblich unterlegt; Schwarz: *TrbcL*, Terminatorsequenz des Gens *rbcL* aus Tabak; Blau: GUS, Grün: GFP (beides Reportergene); Rot: *PrpoB*-Fragmente; Grau: *LrbcL(S)*, leader-Sequenz des Gens *rbcL* aus Tabak. Deren Einbau erfolgt über die Restriktionsschnittstellen *PstI/XhoI* (*TrbcL*), *BamHI/PstI* (GUS, GFP), *EagI/BamHI* (*LrbcL(S)*), *SacI/BamHI* (*PrpoB*-Fragmente; pSH6, pSH7) und *SacI/EagI* (*PrpoB*-Fragmente; pSH15, pSH16). Die Zahlen geben den Abstand in Nukleotiden relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle an. Nicht maßstabsgerecht.

In das GFP/*TrbcL*-Konstrukt wurde zudem eine kurze leader-Sequenz des Gens *rbcL* [*LrbcL(S)*] in die *EagI/BamHI*-Schnittstelle eingebracht (3). Die leader-Sequenz unterstützt während der Translation die Bindung zwischen der 5'-16S rRNA und der mRNA, welches zu einer Erhöhung der Expression der Reportergene führt.

In die gewonnenen GUS/*TrbcL*- sowie *LrbcL*(S)/GFP/*TrbcL*-Konstrukte wurden *rpoB*-Promotorsequenzabschnitte unterschiedlicher Länge inseriert (4). So folgte über die *SacI/BamHI*-Schnittstelle der Einbau der Promotorfragmente *PrpoB*_(-277/+339) und *PrpoB*_(-28/+339) in das GUS/*TrbcL*-Plasmid, resultierend in pSH6 und pSH7 sowie der *rpoB*-Promotorfragmente *PrpoB*_(-277/+6) und *PrpoB*_(-28/+6) in den *LrbcL*(S)/GFP/*TrbcL*-Vektor, aus denen pSH15 und pSH16 hervorgingen. Die Sequenz der Gesamtkonstrukte wurde mittels Sequenzanalyse überprüft. Anschließend wurden pSH6, pSH7 sowie pSH15, pSH16 durch biolistische Transformation in das Plastom von *Nicotiana tabacum* eingebracht (Kapitel 2.2.5). Dort findet eine homologe Rekombination zwischen der Zielsequenz des Chloroplastengenoms und der *trnM-trnG*-Region des Vektors statt.

3.3.2 Homoplasmietest der transformierten Pflanzenlinien

Spectinomycin-resistente Transformanten aus der Plastidentransformation durchliefen drei Regenerationszyklen und wurden mittels PCR unter Verwendung der Primer 5'RB94/3'RB94 auf die Integration des Transgens ins Plastom überprüft (5'RB94: GGATTGTTGGTATAGTTGGCCGT; 3'RB94: TATTTGTACAGATAGGGTGGGA; Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zur PCR-Analyse wurden für den Nachweis der Homoplasmie *Southern*-Analysen durchgeführt. Dafür kam eine zum plastidären *psaB*-Gen komplementäre, radioaktiv markierte DNA-Sonde zur Anwendung, die mittels PCR und genspezifischer *psaB*-Primer aus dem Plastom von *Nicotiana tabacum* amplifiziert wurden (Tabelle 2.8). Nach der Restriktion von Gesamt-Tabak-DNA mit *Bgl*II, Auftrennung auf einem 0,8%-Agarosegel, Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran sowie Hybridisierung mit der *psaB*-DNA-Sonde wurde für NtSH-6.2 (*PrpoB*-277/+339) eine Bande von 9610 bp, für NtSH-7.14, -7.21 (*PrpoB*-28/+339) von 9360 bp, für NtSH-15.16, -15.75, -15.86 (*PrpoB*-277/+6) von 8185 bp, für NtSH-16.25, -16.28 und -16.30 (*PrpoB*-28/+6) von 7936 bp detektiert, die das Restriktionsfragment mit entsprechendem *rpoB*-Promotorfragment, Reportergen sowie Terminator- und *aadA*-Kassette enthalten (Abbildung 3.15, Spuren 2, 5-12). Im Unterschied zu NtSH-6.7, NtSH-15.75, -15.86, NtSH-16.25 und -16.30 wurde für NtSH-6.2, NtSH-7.14, NtSH-15.16 sowie NtSH-16.28 kein Wildtypsignal bei 3491 bp detektiert (Spuren 2, 5, 6, 11), womit der Nachweis der Homoplasmie gegeben war. Als Negativkontrolle diente Wildtyp-DNA (Spuren 1, 4). Auch nach einer Überexposition der Blots wurde kein Signal für das Wildtypplastom in den transformierten Linien beobachtet (Daten nicht gezeigt). Demnach wurden in den drei Selektionszyklen alle plastidären Wildtyp-DNA-Moleküle vollständig segregiert.

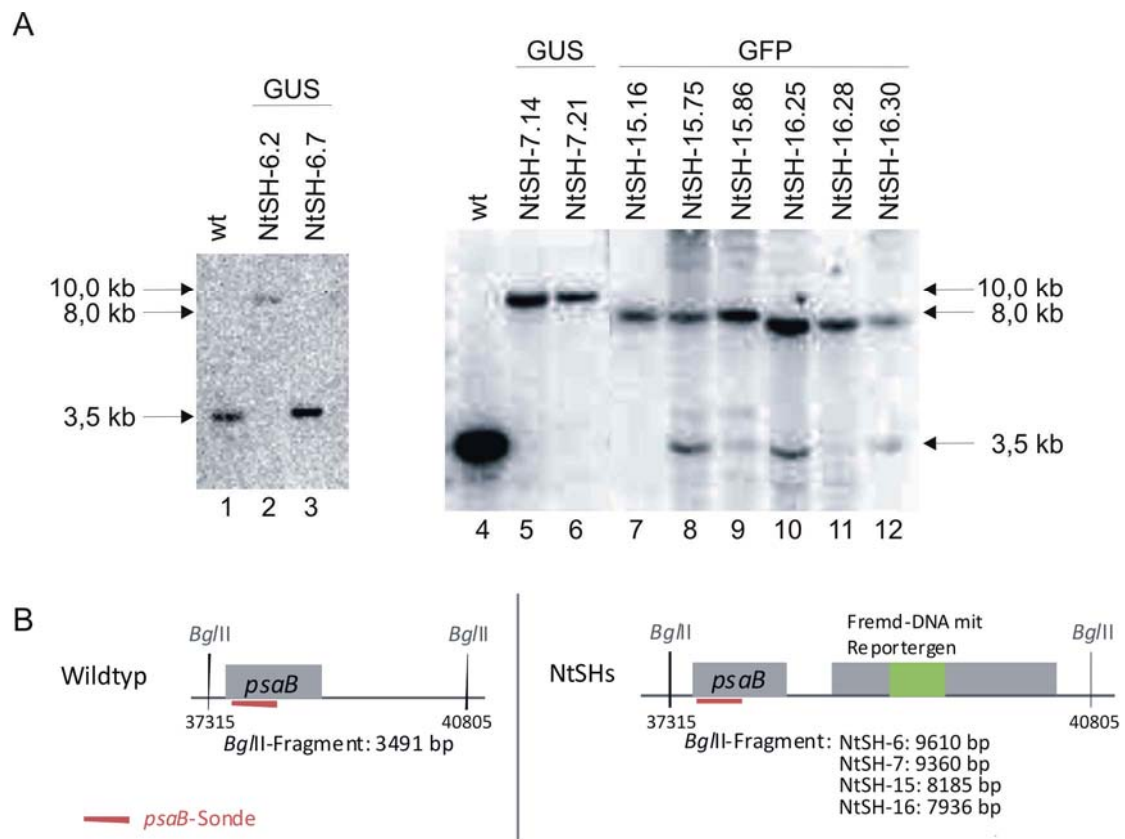


Abbildung 3.15: Southern-Analyse der transplastomen NtSH-Pflanzenlinien mit *psaB*-DNA-Sonde. (A) Für den Test auf Homoplasmie der transplastomen Pflanzenlinien wurde 5 µg von genomischer Gesamt-DNA aus den transplastomen Mutanten NtSH-6.2, -6.7, NtSH-7.14, -7.21, NtSH-15.16, -15.75, -15.86, NtSH-16.25, -16.28, -16.30 sowie aus Wildtyp-Tabak (wt) mit *Bgl*II verdaut und auf einem 0,8%-Agarosegel aufgetrennt. Für die Hybridisierung wurde eine genspezifische, radioaktiv markierte *psaB*-DNA-Sonde, die den transgenen Bereich umfasst, verwendet. Die Bandengrößen sind links angezeigt. Das Restriktionsmuster zeigt den Homoplasmiestatus für NtSH-6.2, NtSH-7.14, -7.21, NtSH-15.16 und NtSH-16.28. (B) Schematische Darstellung des transgenen Bereichs im Tabakplastom. Gezeigt sind die *Bgl*II-Schnittstellen sowie die Längen der Restriktionsfragmente für Tabak-Wildtyp und transplastomen NtSH-Linien. Die Sonde für den Southern-Blot in (A) ist mit einer roten horizontalen Linie markiert.

Als zusätzlichen Nachweis für die Integration der Reportergene wurden die *psaB*-hybridisierten Membranen gewaschen (*strippen*) und anschließend mit den radioaktiv markierten GUS- bzw. GFP-Sonden hybridisiert (Kapitel 2.2.7). Das Template für die GUS-Sonde wurde durch Amplifizierung des GUS-Fragments gewonnen. In Abbildung 3.16A konnte wie erwartet bei den transgenen NtSH-6.2 sowie NtSH-7.14 und NtSH-7.21 Pflanzenlinien ein GUS-Fragment mit einer Größe von 9360 bp detektiert werden (Spuren 2, 5, 6). Die NtSH-15.16, NtSH-15.75, NtSH-15.86, NtSH-16.25, NtSH-16.28 und NtSH-16.30 Pflanzenlinien sowie der Wildtyp zeigten keine Hybridisierung mit der GUS-Sonde (Spuren 1, 4, 7-12). Um die Integration der *rpoB*-Promotor::GFP-Konstrukte in das Plastom zu verifizieren, wurde die Membran nochmals gewaschen (*strippen*) und anschließend mit einer GFP-Sonde hybridisiert (Abbildung 3.16B). Die erwarteten Hybridisierungssignale einer

A

GUS

wt NtSH-6.2 NtSH-6.7

10,0 kb
8,0 kb
3,5 kb

1 2 3

GUS

wt NtSH-7.14 NtSH-7.21

10,0 kb
8,0 kb
3,5 kb

4 5 6

GFP

NtSH-15.16 NtSH-15.75 NtSH-15.86 NtSH-16.25 NtSH-16.28 NtSH-16.30

7 8 9 10 11 12

B

GUS

wt NtSH-7.14 NtSH-7.21

10,0 kb
8,0 kb
3,5 kb

4 5 6

GFP

NtSH-15.16 NtSH-15.75 NtSH-15.86 NtSH-16.25 NtSH-16.28 NtSH-16.30

7 8 9 10 11 12

C

Wildtyp

BglII

37315

psaB

40805

BglII-Fragment: 3491 bp

— GUS- bzw. GFP-Sonde

NtSHs

BglII

37315

psaB

Fremd-DNA mit Reportergen

40805

BglII-Fragment: NtSH-6: 9610 bp
NtSH-7: 9360 bp
NtSH-15: 8185 bp
NtSH-16: 7936 bp

Abbildung 3.16: Southern-Hybridisierung mit GUS- und GFP-Sonde nach „strippen“ der Membran. (A) Nur die NtSH-6.2, NtSH-7.14 und -7.21 Pflanzenlinien mit dem GUS-Konstrukt zeigen eine Hybridisierung der Sonde bei 9610 bp bzw. 9360 bp. Die NtSH-15.16, NtSH-15.75, NtSH-15.86, NtSH-16.25, NtSH-16.28 und NtSH-16.30 Pflanzenlinien sowie der Wildtyp (wt) weisen keine Hybridisierung mit der GUS-Sonde auf. (B) Mit der GFP-Sonde wurde in den NSH-15 Pflanzen ein 8185 bp und in den NSH-16 Pflanzen ein 7936 bp großes Fragment nachgewiesen. In den NtSH-15.75 und NtSH-15.86 Pflanzenlinien wurde eine zweite Bande detektiert. (C) Schematische Darstellung des transgenen Bereichs im Tabakplastom mit den Schnittstellen von *Bg*/II. Gezeigt sind die *Bg*/II-Schnittstellen sowie die Längen der Restriktionsfragmente für die transplastomen NtSH-Linien. Die Sonde für den *Southern*-Blot in (A+B) ist mit einer grünen horizontalen Linie markiert.

In den Pflanzenlinien NtSH-15.75 und NtSH-15.86 wurden jedoch zwei GFP-Fragmente nachgewiesen (Spuren 8 und 9). Das kleinere Fragment lag bei einer Größe von 7930 bp und war somit ca. 250 bp kleiner als das erwartete GFP-Fragment mit 8185 bp. Da die kleinere Signalbande nicht mit der *psaB*-Sonde detektiert worden war, erscheint eine Deletion in der Region des *psaB*-Gens wahrscheinlich. Daher sind diese beiden Pflanzen homoplastomisch hinsichtlich ihres transplastomen Zustands, allerdings heteroplastomisch bezüglich des integrierten Transgens. Die NtSH-15.75 und NtSH-15.86 wurden aus diesem Grund nicht für die vergleichenden Analysen verwendet.

3.3.3 Analyse der Reporter-Gen-Transkriptakkumulation in den *PrpoB*-Deletionsmutanten

Um die Transkription der Reportergene in den unterschiedlichen *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten zu vergleichen, wurden mittels quantitativer *real-time* RT-PCR die Transkriptmengen ermittelt (Kapitel 2.2.4.10). Hinsichtlich der GUS-Expression wurde das *PrpoB*_(-277/+339)::GUS-Fragment (NtSH-6 Pflanzenlinien) und das *PrpoB*_(-28/+339)::GUS-Fragment (NtSH-7 Pflanzenlinien) bzw. der GFP-Expression die Pflanzenlinien NtSH-15 (*PrpoB*_(-277/+6)::GFP-Fragment) und NtSH-16 (*PrpoB*_(-28/+6)::GFP-Fragment) untersucht (Abbildung 3.17). Die beiden *PrpoB*::GUS-Linien besitzen zwar den endogenen 5'-Bereich des *rpoB*-Gens, unterscheiden sich jedoch in der Länge der Sequenz stromaufwärts des Promotors. Zwischen den beiden transplastomen Pflanzenlinien konnten keine signifikanten Unterschiede in der Transkriptakkumulation festgestellt werden. Im Gegensatz zu NtSH-6.2 und NtSH-7.14 mit der 5'-untranslatierten Region aus dem endogenen 5'-Bereich des *rpoB*-Gens, besitzen die Pflanzenlinien NtSH-15.16 und NtSH-16.28 den kurzen *rbcL* leader am 5'-Ende. Außerdem unterscheiden sich die beiden Mutanten im 5'-Bereich stromaufwärts des Promotors. So umfasst NtSH-15.16 den Bereich bis -277, wohingegen NtSH-16.28 nur 28 bp der Promotorregion stromaufwärts des *rpoB*-Promotors besitzt (Abbildung 3.17B).

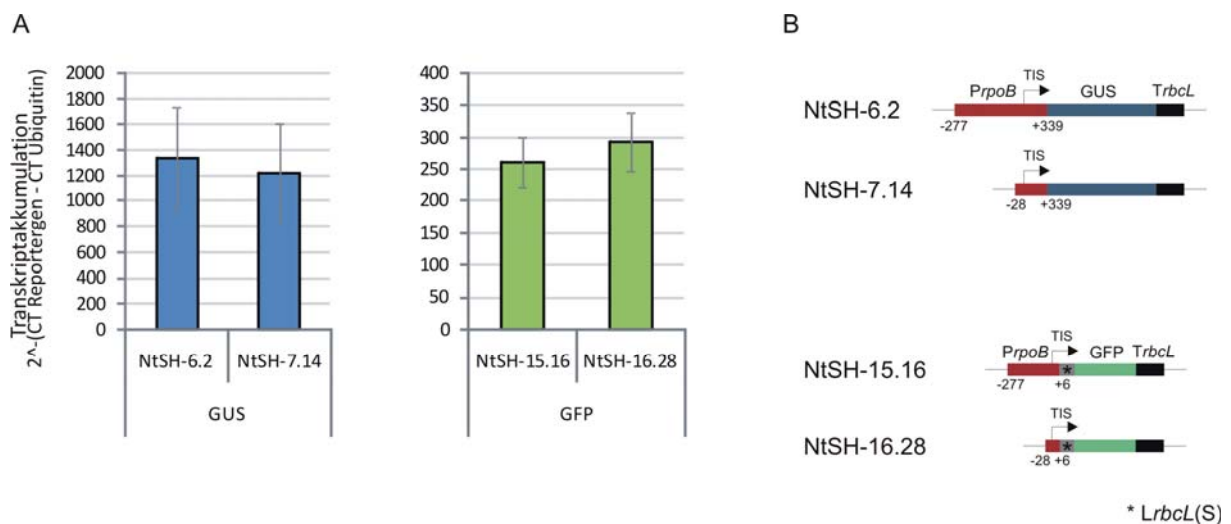


Abbildung 3.17: Transkriptakkumulation von GUS und GFP in den transplastomen Tabaklinien NtSH. (A) Die Pflanzen mit den Promotorkonstrukten NtSH-6 *PrpoB*_(-277/+339), NtSH-7 *PrpoB*_(-28/+339) sowie NtSH-15 *PrpoB*_(-277/+6), NtSH-16 *PrpoB*_(-28/+6) wurden auf MS-Medium für 7 Tage angezogen. Mit der UBQ-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und als Mittelwerte von $\Delta C_T = 2^{-(CT \text{ Reporter} - CT \text{ Ubiquitin})}$ aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SA angegeben. (B) Schematische Darstellung der Transgen-Kassette der untersuchten transplastomen Pflanzenlinien. Die Zahlen geben den *rpoB*-Promotorbereich (*PrpoB*) bzgl. der Transkriptionsinitiationsstelle (TIS) an. Die NtSH-15.16 und NtSH-16.28 Linien enthalten zwischen *PrpoB* und GFP-Reportergen eine kurze *leader* des *rbcL*-Gens aus *N. tabacum* [LrbcL (S)].

Der GFP-Transkriptmengennachweis der NtSH-16.28 Pflanzenlinie zeigte im Vergleich zu NtSH-15.16 keine Änderung in der Akkumulation (Abbildung 3.17A). Folglich scheint sich der kürzere 5'-Bereich in NtSH-7.14 bzw. NtSH-16.28, nicht auf die Transkriptstabilität auszuwirken. Interessanterweise wiesen die *PrpoB*::GUS-Konstrukte mit dem längeren 3'-Bereich des *rpoB*-Promotors bis +339 im Vergleich zu den *PrpoB*::GFP-Konstrukten (+6) eine im Durchschnitt 4,6fache höhere Transkriptakkumulation auf. Verantwortlich für den Unterschied in den Reporter-gen-Transkriptmengen könnten sowohl Elemente im 3'-Bereich von +6 bis +339 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle als auch der kurze *rbcL leader* in NtSH-15.16 und NtSH-16.28 sein.

3.3.4 Untersuchung neu initiiertter Reportergentranskripte in den *PrpoB*-Deletionsmutanten

Ob die bei der Transkriptakkumulation beobachteten Effekte auch auf Transkriptionsebene festzustellen sind, wurde die Bildung neu initiiertter Reportergentranskripte in den transplastomen Linien NtSH-6.2 (*PrpoB*_(-227/+339)), NtSH-7.14 (*PrpoB*_(-28/+339)) sowie NtSH-15.16 (*PrpoB*_(-28/+6)) und NtSH-16.28 (*PrpoB*_(-28/+6)) mittels *run-on*-Analysen untersucht (Kapitel 2.2.10). Wie in Abbildung 3.18 gezeigt, konnten auch bezüglich der Akkumulation der *run-on*-GUS-Transkripte keine signifikanten Unterschiede zwischen *PrpoB*::GUS-Deletionsmutanten detektiert werden.

Bei den *PrpoB*::GFP-Deletionsmutanten mit dem kurzen *rbcL leader* stromaufwärts des *rpoB*-Gens konnte eine im Vergleich zu NtSH-15.16 mit dem Promotorbereich von -277 bis +6 in den NtSH-16.28 mit dem kürzeren 5'-Bereich bis -28 eine Abnahme der *run-on*-Transkriptmengen beobachtet werden. GFP in NtSH-16.28 wies nur noch ein Drittel der Transkriptionsaktivität in NtSH-15.16 auf. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung war die Abnahme in NtSH-16.28 jedoch nicht signifikant. Die hinsichtlich der Transkriptionsaktivität von GUS in den *PrpoB*::GUS-Konstrukten verringerten *run-on*-Transkriptmengen von GFP in den *PrpoB*::GFP-Konstrukten sind möglicherweise auf regulierende Elemente im *rbcL leader* und/oder im Bereich +6 bp bis +339 bp stromabwärts der Transkriptionsinitiationsstelle zurückzuführen.

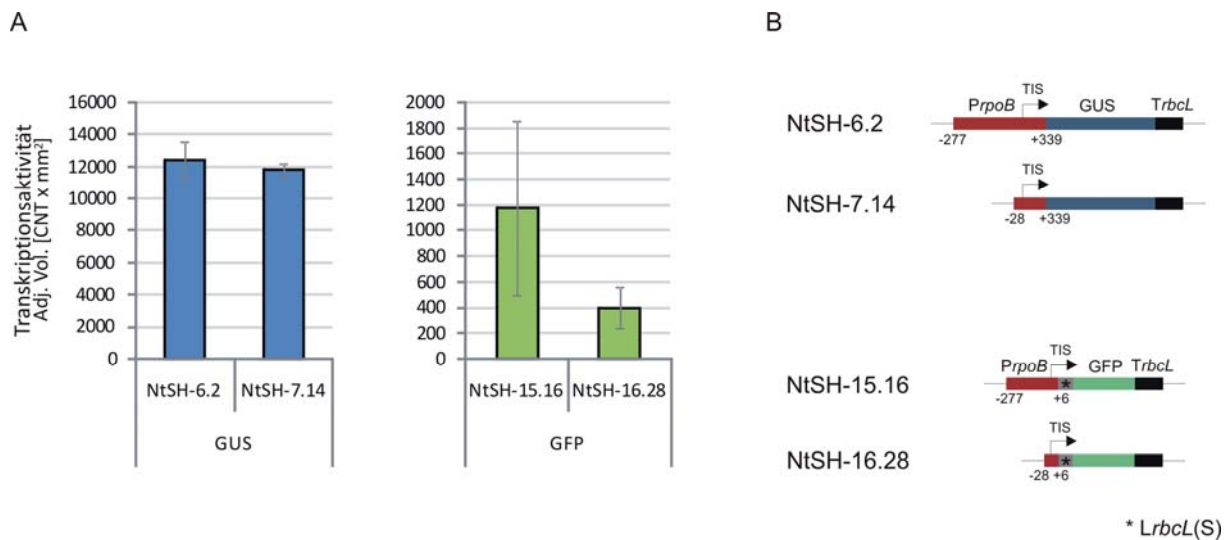


Abbildung 3.18: Transkriptionsaktivität von GUS und GFP in den transplastomen Tabaklinien NtSH. (A) Die Pflanzen mit den Promotorkonstrukten NtSH-6 *PrpoB*_(-277/+339), NtSH-7 *PrpoB*_(-28/+339) sowie NtSH-15 *PrpoB*_(-277/+6), NtSH-16 *PrpoB*_(-28/+6) wurden auf MS-Medium für 7 Tage angezogen. Chloroplasten wurden aus dem gesamten Pflanzenmaterial isoliert und für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet. Gezeigt ist die Transkriptionsaktivität der Reportergene in den transplastomen Linien als Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten ± SA. (B) Schematische Darstellung der Transgen-Kassette der untersuchten transplastomen Pflanzenlinien. Die Zahlen geben den *rpoB*-Promotorbereich (*PrpoB*) bzgl. der Transkriptionsinitiationsstelle (TIS) an. Die NtSH-15.16 und NtSH-16.28 Linien enthalten zwischen *PrpoB* und GFP-Reportergen eine kurze *leader* des *rbcL*-Gens aus *N. tabacum* [*LrbcL* (S)].

3.3.5 Auswirkungen der Cytokininapplikation bei den *PrpoB*-Deletionsmutanten

In den Kapiteln 3.1 und 3.2 wurde der Einfluss von Cytokinin auf die Transkription und Transkriptakkumulation in den Chloroplasten von Tabak und Arabidopsis in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanze (senescente, junge Pflanzen) sowie vom endogenen Cytokiningehalt (Pflanzen mit konstitutiver Cytokinindefizienz: *Nta:AtCKX2*, *Ath:CKX2*) untersucht. Die Regulation der Expression des Plastidengens *rpoB* ist dabei von besonderem Interesse, ist es doch Teil des *rpoB/C1/C2*-Operons, welches die Untereinheiten β , β' und β'' der plastidären RNA-Polymerase (PEP) kodiert (Kapitel 1.5). In sieben-Tage-alten Tabakpflanzen konnte nach 120 min Cytokininbehandlung (BA) eine im Vergleich zur Kontrolle über 2fach höhere Transkriptionsaktivität von *rpoB* detektiert werden (Abbildung 3.5). Zu diesem Zeitpunkt akkumulierten zwar die BA-behandelten und unbehandelten Tabakpflanzen die gleichen *rpoB* mRNA-Mengen, die Akkumulation der kernkodierten plastidären RNA-Polymerase (*RpoTp*) war aber interessanterweise auf das 5fache gesteigert (Abbildung 3.6). Möglicherweise bewirkte diese Steigerung die Hochregulierung der *rpoB*-Transkription. Mit den in dieser Arbeit hergestellten *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten wurde untersucht, ob der Cytokinineffekt auf die Transkription von *rpoB* über Faktoren vermittelt wird, die mit Sequenzelementen im *rpoB*-Promotorbereich von -277 bis +339 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle interagieren. Zu diesem Zweck wurden sieben-Tage-alte,

Tabakmutanten mit Deletionen *rpoB*-Promotorbereich von -277/+339, -28/+339, -277/+6 und -28/+6 für 120 min mit BA behandelt.

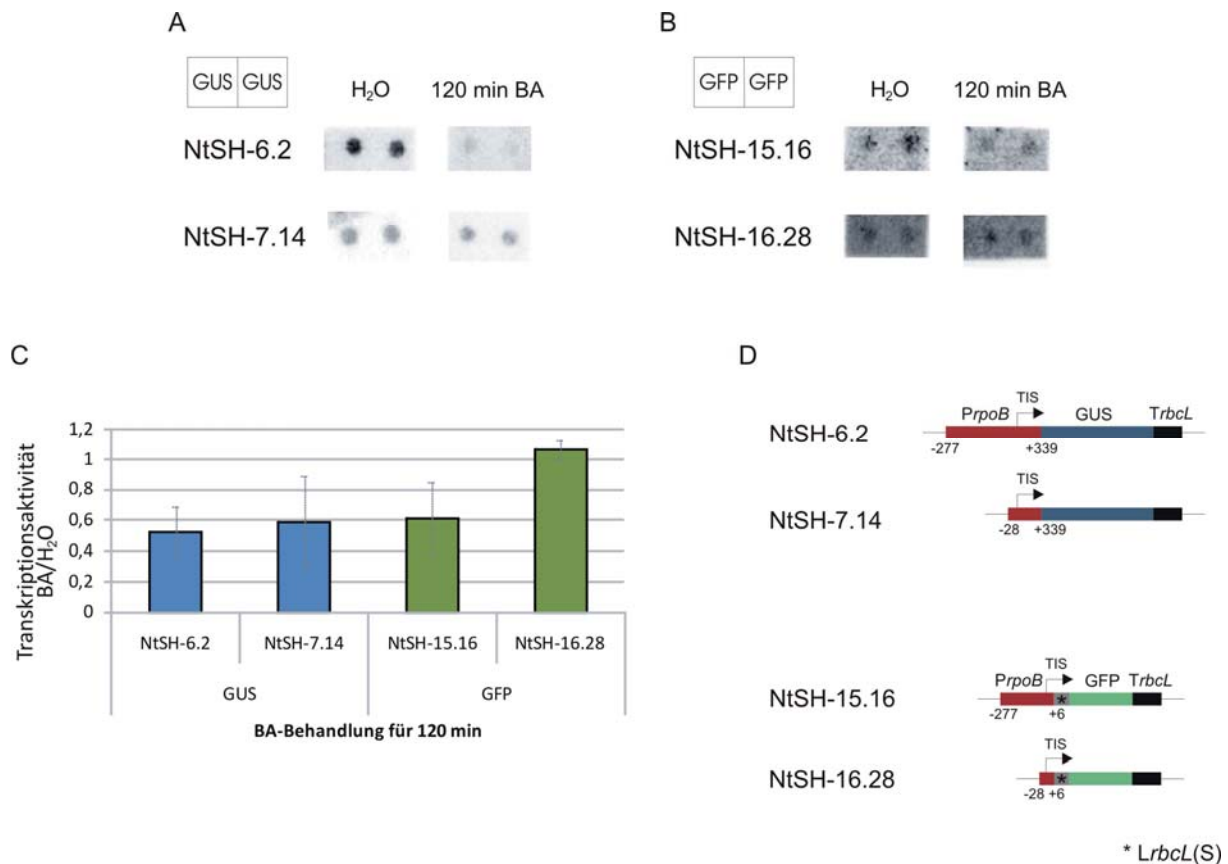


Abbildung 3.19: Cytokinineffekt auf die Transkription von GUS und GFP in den transplastomen Tabaklinien NtSH. Die Pflanzen mit den Promotorkonstrukten NtSH-6 *PrpoB*_(-277/+339), NtSH-7 *PrpoB*_(-28/+339) sowie NtSH-15 *PrpoB*_(-277/+6), NtSH-16 *PrpoB*_(-28/+6) wurden in flüssigem ½ MS-Medium für 7 Tage angezogen, dann für 120 min im Licht in Wasser oder BA inkubiert (siehe Kapitel 2.2.3). Chloroplasten wurden aus dem gesamten Pflanzenmaterial isoliert und für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet. [³²P]-markierte Transkripte wurden isoliert und mit den zuvor auf der Nylonmembran aufgetragenen GUS- bzw. GFP-Sonden nach Schema (A) hybridisiert. Radioaktive Signale wurden detektiert und quantifiziert wie in Kapitel 2.2.10 beschrieben. (A) GUS-Dot-Blot Autoradiogramm für NtSH-6 *PrpoB*_(-277/+339), NtSH-7 *PrpoB*_(-28/+339). (B) GFP-Dot-Blot Autoradiogramm für NtSH-15 *PrpoB*_(-277/+6), NtSH-16 *PrpoB*_(-28/+6). Die für die repräsentativen Dot-Blots gezeigten Daten können ein wenig von den Mittelwerten aus den mehrmals durchgeführten Experimenten (C) abweichen. Das Verhältnis der Transkriptionsraten in Chloroplasten aus Cytokinin-behandelten NtSH-Linien zu denen in Chloroplasten aus Kontrollblättern (im Wasser) sind als Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten ± SA gezeigt. (D) Schematische Darstellung der Transgen-Kassette der untersuchten transplastomen Pflanzenlinien. Die Zahlen geben den *rpoB*-Promotorbereich (*PrpoB*) bzgl. der Transkriptionsinitiationsstelle (TIS) an. Die NtSH-15.16 und NtSH-16.28 Linien enthalten zwischen *PrpoB* und GFP-Reportergen eine kurze *leader* des *rbcL*-Gens aus *N. tabacum* [*LrbcL* (S)].

Der Cytokinineffekt auf die Transkription sowie Transkriptakkumulation der Reportergene in diesen transplastomen Tabaklinien wurde mit Hilfe von *run-on*- bzw. quantitativer *real-time* RT-PCR-Analysen bestimmt (Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20).

Die Transkriptionsaktivität von GUS in den BA-behandelten NtSH-6.2 und NtSH-7.14 Tabaklinien war mit den BA/H₂O-Verhältnissen von 0,5 bzw. 0,6 nahezu gleich stark

runterreguliert. Keine BA-Behandlung verursachte zwischen NtSH-6.2 mit der 5'-Promotorregion bis -277 und NtSH-7.14 mit dem kurzen Promotorbereich bis -28 keine Änderungen in der Reportergentranskriptsynthese (Abbildung 3.18). Dennoch fehlen in beiden Mutanten wichtige Sequenzelemente für eine Cytokinin-vermittelte Aktivierung der Transkription, wie sie im Tabak-Wildtyp zu beobachten war. Interessanterweise stabilisierte die Cytokininbehandlung von NtSH-16.28 mit dem kürzesten Promotorbereich von -28 bis +6 die Transkription von GFP (Abbildung 3.19), wohingegen die vergleichende Mutante mit dem längeren 5'-Bereich bis -277 relativ zur Transkriptionsstartstelle ebenfalls eine reduzierte GFP-Transkriptsynthese aufwies.

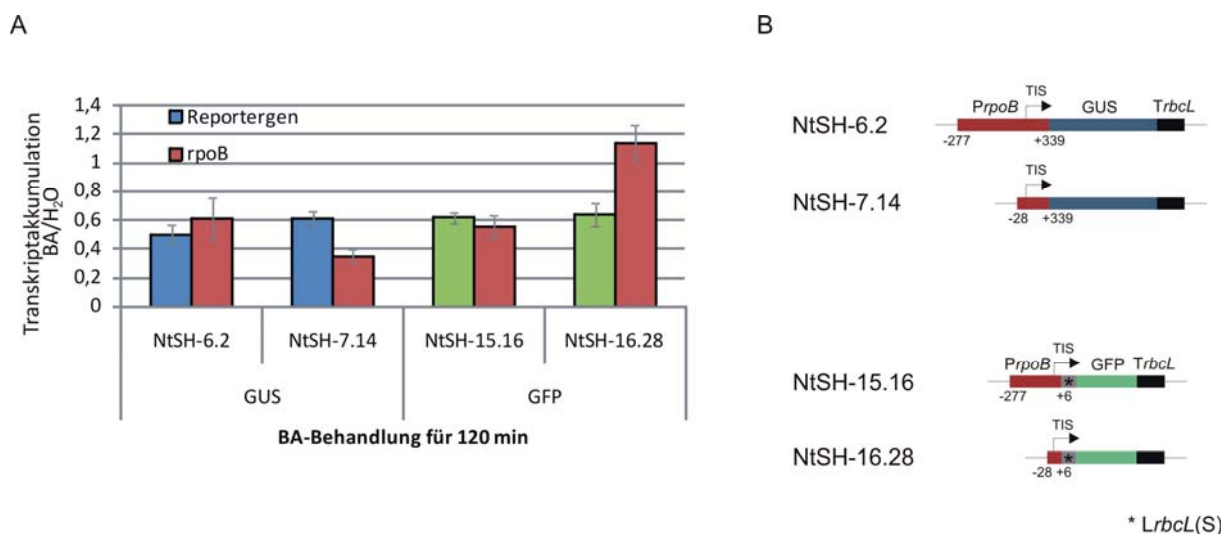


Abbildung 3.20: Cytokinineffekt auf die Transkriptakkumulation von GUS, GFP und *rpoB* in den transplastomen Tabaklinien NtSH. Die Pflanzen mit den Promotorkonstrukten NtSH-6 *PrpoB*_(-277/+339), NtSH-7 *PrpoB*_(-28/+339) sowie NtSH-15 *PrpoB*_(-277/+6), NtSH-16 *PrpoB*_(-28/+6) wurden in flüssigem ½ MS-Medium für 7 Tage angezogen, dann für 120 min im Licht in Wasser oder BA inkubiert (siehe Kapitel 2.2.3) Mit der UBQ-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und sind als Verhältnis mC/wt und mE/wt aus zwei unabhängigen Experimenten ±SA angegeben. (B) Schematische Darstellung der Transgen-Kassette der untersuchten transplastomen Pflanzenlinien. Die Zahlen geben den *rpoB*-Promotorbereich (*PrpoB*) bzgl. der Transkriptionsinitiationsstelle (TIS) an. NtSH-15.16 und NtSH-16.28 enthalten zwischen *PrpoB* und GFP-Reportergen eine kurze *leader* des *rbcL*-Gens aus *N. tabacum* [*LrbcL* (S)].

Die verminderte Transkription von GUS in NtSH-6.2 sowie NtSH-7.14 bzw. GFP in NtSH-15.16 mit dem kürzeren 3'-*rpoB*-Promotorbereich spiegelte sich auch auf dem Transkriptlevel wider. Nach 120 min Inkubation der Tabakmutanten in BA-Lösung konnte eine reduzierte Transkriptakkumulation der Reportergene in NtSH-6.2 (0,5), NtSH-7.14 (0,6), NtSH-15.16 (0,6) beobachtet werden. Obwohl BA die Transkription von GFP in NtSH-16.28 mit dem kürzesten Promotorbereich (*PrpoB*_{-28/+6}) im Unterschied zu den anderen *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten stabilisierte, war seine Transkriptmenge reduziert. Diese Beobachtung zusammen mit den Ergebnissen aus den BA-behandelten Tabak-, Arabidopsis- und den

transgenen *CKX2*-Pflanzen lassen vermuten, dass Cytokinin sowohl die Transkription als auch die Transkriptstabilität differentiell reguliert. Möglicherweise fehlten in diesem Fall aber nur für die Transkriptstabilisation wichtige Sequenzelemente in den Promotor-Reportergen-Konstrukten. Überraschenderweise waren die mRNA-Mengen von *rpoB* in den Promotor-Deletionsmutanten, bis auf NtSH-16.28 (*PrpoB*_{-28/+6}), deutlich verringert, wohingegen im BA-behandelten und unbehandelten Wildtyp-Tabak gleiche Mengen an *rpoB*-Transkripten (Abbildung 3.6) akkumulierten. Die transplastome NtSH-16.28 zeigte wie der Wildtyp bezüglich der Transkriptakkumulation von *rpoB* das BA/H₂O-Verhältnis von 1,0.

3.4 Transgene Tabakpflanzen mit einer Punktmutation im *rpoB*-core-Promotor-Motiv CAT

Bisherige *in vitro*-Punktmutations- und Deletionsstudien zeigten, dass der Tabak-*rpoB*-Promotor innerhalb einer AT-reichen Region von -14 bis +1 bp bezüglich der Transkriptionsinitiationsstelle und -345 bp vor dem *rpoB*-Startkodon liegt. Zudem besitzt er ein *core*-CAT-Motiv im Bereich von -8 bp bis -6 bp, charakteristisch für NEP-Promotoren des Typs Ia mit dem YRTa-*core*-Motiv. Punktmutationen in diesem Bereich führten zu einer signifikanten Reduzierung der NEP-Aktivität *in vitro* (Liere und Maliga, 1999a). Legen (2002) führte erste *in vivo*-Promotorstudien durch, um die Bedeutung des *in vitro* charakterisierten 'CAT'-Promotors von *rpoB* zu bestimmen. Dafür wurden transplastome Tabaklinien hergestellt, die neben dem *aadA*-Gen als Resistenzkassette ein 'CAC' statt des Wildtyp-*core*-Promotormotiv 'CAT' besaßen (mC-Mutante; Abbildung 3.21; siehe auch Kapitel 2.2.6). Mit Tabakpflanzen ohne diese Punktmutation, aber mit der *aadA*-Kassette sollte parallel überprüft werden, ob Änderungen in der Transkriptionsaktivität im Zellkern und/oder in den Chloroplasten tatsächlich aus der Punktmutation oder möglicherweise aus der Insertion der *aadA*-Kassette resultieren.

Der Mutationsanalyse zur Folge hat der *in vitro* charakterisierte NEP-Promotor keine Bedeutung für die Expression des Operons *in vivo*. Zum einen wuchsen die mC-Mutanten unter autotrophen Bedingungen, zeigten bezüglich Morphologie, Blattbildung und -farbe keine Unterschiede zum Wildtyp-Tabak und glichen damit nicht den weißen *knock-out*-Phänotypen der *rpoB*-Gene (Allison et al., 1996; De Santis-Maciossek et al., 1999). Zum anderen konnte die Nutzung von *PrpoB*-345 *in vivo* nicht verifiziert werden. Damit war die frühere Annahme, dass PEP unter vollständiger Regulationskontrolle von NEP steht, in Frage gestellt. Vielmehr wurde ein *Primer Extension*-Transkript in der Nähe eines putativen PEP-Promotors identifiziert. Demnach sollten möglicherweise autoregulatorische Rückkopplungsschleifen eine Rolle in der PEP-Expression spielen. Da jedoch der Grund für

den Wildtyp-Phänotyp der mC-Mutante nicht eindeutig geklärt werden konnte, wurden in dieser Arbeit die *in vivo*-Promotorstudien wiederholt und fortgeführt. Dabei standen folgende Fragen im Fokus der Analysen: Wird *PrpoB*-345 tatsächlich *in vivo* nicht genutzt? Gibt es Hinweise auf weitere Promotoren, die die Transkription von *rpoB* gewährleisten?

3.4.1 Sequenzanalyse der transformierten Linien

Für die *in vivo*-Analyse des *rpoB*-Promotors von Tabak wurden die von Frau Dr. J. Legen zur Verfügung gestellte *core-rpoB*-Promotormutante mC und die Kontrollmutante mE erneut mittels Sequenzierung geprüft (Tabelle 2.3). Die Sequenzanalyse bestätigte den erfolgreichen Austausch der Wildtyp-Base T durch die eingeführte Base C. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollmutante mE keine Punktmutation im CAT-Motiv (Abbildung 3.21).

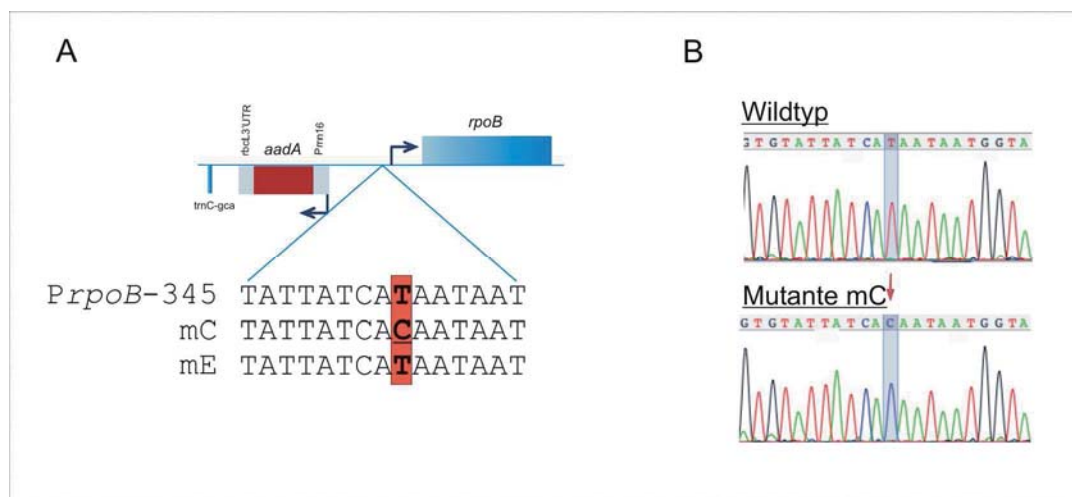


Abbildung 3.21: Die *rpoB*-Promotorregion der mC-Mutante. (A) Schematische Darstellung der *rpoB*-Promotorregion im Wildtyp (*PrpoB*-345) sowie in den Mutanten mC und mE. (B) Sequenzierungsanalyse der *rpoB*-core-Promotorregion der mC-Mutante. Die Amplifikationsprodukte der *rpoB*-Promotorregion der mC-Mutante wurde mittels PCR mit dem Primerpaar 5'*PrpoB*-345-seq/3'*PrpoB*-345-seq (siehe Tabelle 2.3) erhalten und direkt sequenziert. Der Ausschnitt der Chromatogramme zeigt den erfolgreichen Austausch der Wildtyp-core-Promotorsequenz CAT durch CAC.

3.4.2 Transkriptionelle Charakterisierung der *rpoB-core*-Promotormutanten

Ein Defekt in der *rpoB*-Expression sollte sich in einer deutlichen Änderung der Genexpression des gesamten plastidären Chromosoms ausdrücken. Um zu untersuchen, ob die Mutation im *core*-Promotormotiv einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität sowie Transkriptakkumulation von *rpoB* selbst sowie anderer plastidärer Gene hat, wurden *run-on*-Analysen bzw. quantitative *real-time* RT-PCR-Analysen durchgeführt.

Die Punktmutation im *rpoB-core*-Promotormotiv beeinflusste nicht die Transkription von *rpoB* (Abbildung 3.22). Zudem führte *PrpoB-345_{CAC}* nicht, wie erwartet, zu einer Beeinträchtigung von PEP-transkribierten Genen. Folglich war in den Chloroplasten PEP aktiv. So waren plastidäre Gene sowohl mit PEP-Promotor (*petB*, *petD*, *rbcL*) als auch mit PEP- und NEP-Promotoren (*atpB*, *rrn16*, *rps4*, *ndhF*) in ihrer transkriptionellen Aktivität nicht gemindert. Für *psaB* (PEP) und für *accD* (NEP) kam es im Vergleich zum Wildtyp zu einer leichten Induktion. Eine Halbierung der Transkriptsynthese erfolgte dagegen für *atpH* (PEP/NEP), *psaA* und *psbA* (beide PEP) in mC, aber auch in mE. Im Gegensatz zu diesen drei Genen verdoppelten sich die *run-on*-Transkripte von *rpl23* (PEP/NEP) in beiden Mutanten. Für die übrigen, getesteten Plastidengene konnten keine eindeutigen Aussagen über einen Effekt der Punktmutation im *rpoB-core*-Promotor auf deren Transkription getroffen werden, da selbst zwischen Wildtyp und der Kontrollmutante mE Unterschiede in den Transkriptionsmustern auftraten. Möglicherweise sind sie auf Unterschiede im Entwicklungsstadium der 5-Wochen-alten Tabakpflanzen zum Zeitpunkt der Ernte zurückzuführen (siehe auch Kapitel 2.2.1). So wurde in mC im Vergleich zum Wildtyp für *psaC* kein, für *atpF*, *psbB* und *psbE* ein leichter Anstieg ihrer Transkriptionsaktivität beobachtet. In der Kontrolle mE, welche die *aadA*-Kassette enthält, nicht aber die Punktmutation, war die Transkription der vier Gene jedoch halbiert. Für *ndhB* und *rps4* zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Die Transkription beider Gene war in der Kontrollmutante (1,9 bzw. 1,7) hochreguliert, wohingegen ihre Transkription in der mC-Linie von der Punktmutation im *rpoB-core*-Promotor unbeeinflusst blieb.

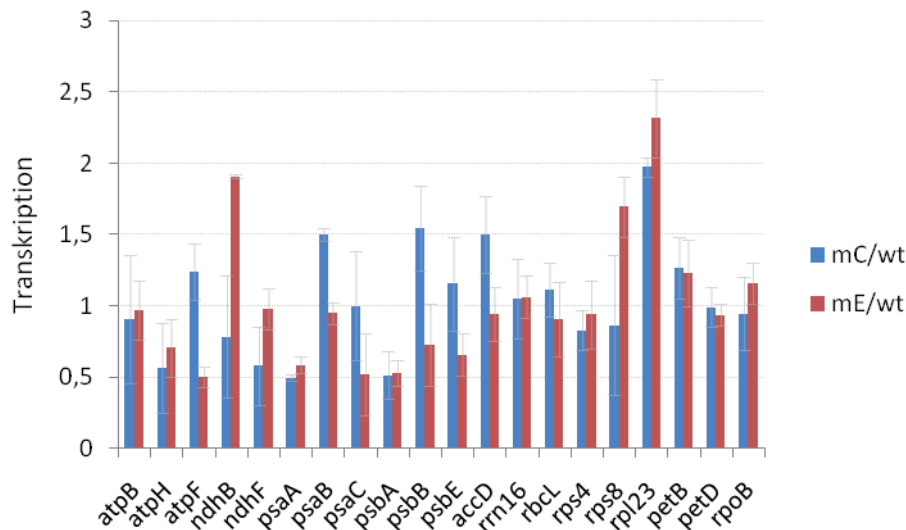


Abbildung 3.22: Einfluss der Punktmutation im *rpoB*-core-Promotormotiv CAT -> CAC auf die Transkriptionsaktivität. Vergleich der Transkriptionsaktivität der plastidären Gene zwischen Wildtyp (wt) und den Mutanten mC und mE. Wildtyp-Tabak (wt) sowie die transplastomen Linien mC und mE wurden auf MS-Medium mit Spectinomycin für 7 Tage, dann für weitere 4 Wochen auf Erde angezogen. Chloroplasten aus dem gesamten Pflanzenmaterial vom Wildtyp sowie von mC und mE wurden isoliert und 5×10^7 für *run-on*-Transkriptionsassays verwendet. Die Transkriptionsraten in Chloroplasten vom Tabak-Wildtyp sowie in denen der transplastomen Linien mC und mE sind als Verhältnis mC/wt und mE/wt von zwei unabhängigen Experimenten \pm SA gezeigt. Die Linie mC enthält eine Punktmutation im *core*-CAT-Motiv des *PrpoB*-345 (CAC), mE ist die Kontrollmutante mit Wildtyp-*rpoB*-core-Promotorsequenz.

In vielen Fällen korrelieren die RNA-Mengen mit denen von *run-on*-Analysen. Operons oder Gene mit hohen Transkriptionsraten gehen in der Regel einher mit einer erhöhten Transkriptakkumulation und umgekehrt. Für *rpoB* konnte solch eine Korrelation nicht beobachtet werden. Während die Transkriptionsaktivität von *rpoB* in mC unverändert blieb, war seine Transkriptakkumulation im Vergleich zum Wildtyp um mehr als die Hälfte verringert (Abbildung 3.23). Jedoch war eine leichte Abnahme der Transkriptmenge ebenfalls in mE zu beobachten. Des Weiteren akkumulierten die nukleären *RpoT*-Gene, welche für plastidäre (*RpoTp*) und/oder mitochondriale (*RpoTmp*, *RpoTm*) RNA-Polymerasen kodieren, in mC mit einem relativen Wert von 0,4 (*RpoTp*) und 0,6 (*RpoTmp*, *RpoTm*) deutlich weniger als im Wildtyp (Menge=1). Wie *rpoB* sank in mE die mRNA-Menge von *RpoTp*, wohingegen die Transkriptmengen von *RpoTmp* und *RpoTm* nahezu dem Wildtyp glichen. Im Unterschied zu *rpoB* spiegelte sich in mC die Transkriptionsaktivität von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* auf die Transkriptmengen wider. So war in beiden Fällen die Transkription von *rbcL* und *rrn16* unbeeinflusst bzw. von *psbA* vermindert, wenn auch diese Runterregulierung auf Transkriptionsebene stärker ausfiel als auf dem Transkriptlevel.

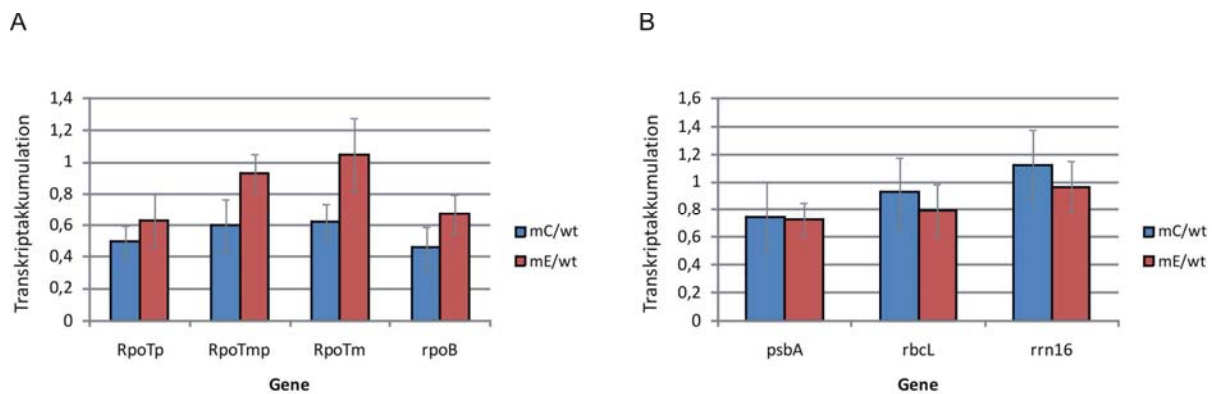


Abbildung 3.23: Einfluss der Punktmutation im *rpoB*-core-Promotormotiv CAT -> CAC auf die Transkriptakkumulation. Wildtyp-Tabak (wt) sowie die transplastomen Linien mC und mE wurden auf MS-Medium für 7 Tage angezogen. Mit der UBQ-Transkriptmenge als interner Standard wurden die mRNA-Mengen mit quantitativer *real-time* RT-PCR ermittelt und sind als Verhältnis mC/wt und mE/wt aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SA angegeben. Die Linie mC enthält eine Punktmutation im *core*-CAT-Motiv des *PrpoB*-345 (CAC), mE ist die Kontrollmutante mit Wildtyp-*rpoB*-core-Promotorsequenz. (A) Relative Transkriptmengen von *RpoTp*, *RpoTmp*, *RpoTm* und *rpoB* (B) Relative Transkriptmengen von *psbA*, *rbcL* und *rrn16*. Die Linie mC enthält eine Punktmutation im *core*-CAT-Motiv des *PrpoB*-345 (CAC), mE ist die Kontrollmutante mit Wildtyp-*rpoB*-core-Promotorsequenz.

Da Änderungen in der Transkription sowie in der Transkriptakkumulation mehrheitlich in beiden Mutanten (mC und mE) zu beobachten waren, scheint nicht die Punktmutation selbst, sondern vielmehr die Insertion der *aadA*-Kassette für den Effekt verantwortlich zu sein. Zusammengefasst korrespondieren die Daten hier nicht mit früheren *in vitro*-Ergebnissen, die dem Promotor *PrpoB*-345 eine entscheidende Rolle in der Transkription von *rpoB* zuschreiben.

3.4.3 Analyse der 5'-UTR des *rpoB*-Operons in *Nicotiana tabacum*

3.4.3.1 5'-Transkriptenden mittels Primer Extension-Analyse

Die qRT-PCR-Analysen deuten darauf hin, dass die Halbierung der Transkriptmenge von *rpoB* aus der Insertion der *aadA*-Kassette resultiert. Dennoch lässt seine Transkription in mC vermuten, dass *PrpoB*-345 entweder nicht für die Transkription dieses Gens essentiell ist oder alternative, kompensatorische Transkriptionsinitiationsstellen existieren. Um diese Frage zu klären, wurden mit Hilfe der *Primer Extension* unter Verwendung von Primern stromaufwärts und stromabwärts von *PrpoB*-345 nach putativen 5'-Transkriptenden gesucht (Kapitel 2.2.8).

Korrespondierend mit dem von Liere und Maliga (1999a) *in vitro* detektierten Promotor (*PrpoB*-345) wurde hier ein Signal bei -344 relativ zum *rpoB*-Startkodon sowohl im Wildtyp als auch in der Kontrollmutante mE, nicht jedoch in mC detektiert (Abbildung 3.24). Damit

wurde gezeigt, dass die Punktmutation im *rpoB-core*-Promotormotiv CAT tatsächlich in das Ausschalten desselben resultiert. Im Folgenden wird nur noch von dem Promotor mit der Bezeichnung *PrpoB-344* gesprochen. Das von Julia Legen (2002) detektierte 5'-Transkriptende -294 relativ zur Translationsstartstelle konnte hier nicht verifiziert werden. Stattdessen terminierten in allen drei RNA-Proben Transkripte an den Positionen -241 und -243. Da sie auch in mC abundant waren, kann es sich bei diesen 5'-Enden nicht um das prozessierte -344 Transkript handeln (siehe oben). Entweder startet bei -241 und -243 tatsächlich die Transkription an einem bisher noch unbekannten Promotor oder die beiden 5'-Enden stammen von einem längeren Transkript stromaufwärts von *PrpoB-344* durch Prozessierung. Mit dem ‚Primer-352‘ war denn auch sowohl im Wildtyp als auch in den beiden Mutanten mC und mE eine erhöhte Akkumulation von -580 und -611 5'-Enden zu beobachten. Mit dem weiter stromaufwärts liegenden ‚Primer-484‘ konnten sie jedoch nicht verifiziert werden. Stattdessen terminierten im Wildtyp sowie in den beiden Mutanten relativ zur Translationsstartstelle 5'-Transkriptenden an -556 und -573. Letzteres sowie die 5'-Enden an den Positionen -580 und -611 lassen aufgrund fehlender Promotormotive eher auf prozessierte 5'-Transkriptenden schließen, deren Primärtranskripte möglicherweise stromaufwärts von ihnen lokalisiert sind. Jedoch wurden mit entsprechenden Primern keine weiteren, gemeinsamen 5'-Transkriptenden für Wildtyp, mC und mE detektiert. Woher diese prozessierten -573, -580 sowie -611 5'-Enden stammen, blieb mit der *Primer Extension*-Methode bisher ungeklärt. In der AT-reichen Sequenz direkt vor -556 befindet sich hingegen das Motiv CGTA für NEP-Promotoren des Typs I.

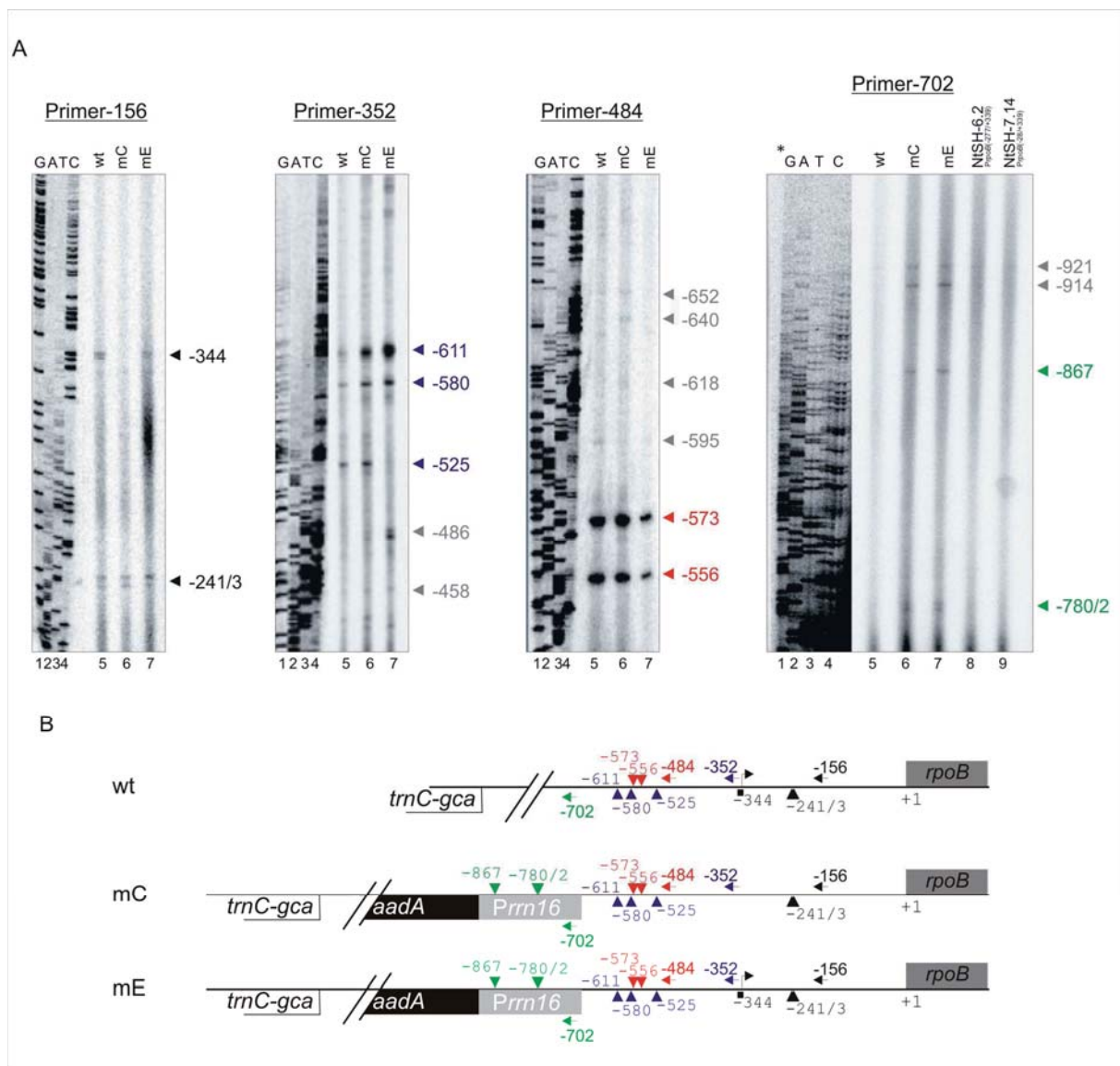


Abbildung 3.24: Primer Extension-Analyse der *rpoB* 5'-UTR. (A) 15 µg Gesamt-RNA vom Tabak-Wildtyp (wt), der Mutanten mC und mE wurden mit mehreren radioaktiv markierten Primern revers transkribiert: Primer -156, Primer -352, Primer -484 und Primer -702, als farbige Pfeile in (B) markiert. Die *Extension*-Produkte wurden in einem 1,2% denaturierenden Polyacrylamidsequenzgel aufgetrennt. Als Referenzen wurden die Amplifikationsprodukte, die die jeweilige *rpoB* 5'-UTR umgeben, mit denselben end-markierten Primern sequenziert. *Extension*-Produkte, die relativ zum *rpoB*-Startkodon bei -344 nt terminieren, wurden detektiert für den Wildtyp und die Kontrollmutante mE, nicht jedoch für mC. *Extension*-Produkte, die relativ zum *rpoB*-Startkodon bei -780/2 nt und -867 nt terminieren, wurden detektiert für mC und mE, nicht jedoch für wt, NtSH-6.2 sowie NtSH-7.14. (B) Gezeigt ist die Lokalisierung der für die *Primer Extension* in (A) verwendeten Primer in der *rpoB* 5'-UTR von wt, mC und mE (Pfeile). Die mittels *Primer Extension* detektierten 5'-Transkriptenden sind einem Dreieck gekennzeichnet. Die Zahlen geben den Abstand in Nukleotiden relativ zum *rpoB*-Startkodon an. Der *rpoB*-Promotor von Tabak (*PrpoB*-344) ist durch ein schwarzes Rechteck, der Transkriptionsinitiationsort mit einem gebogenen Pfeil markiert. *Die Sequenzleiter gilt nicht für wt.

Des Weiteren wurden mit dem ‚Primer-352‘ die 5'-Transkriptenden bei -525, -458 und -484 detektiert, waren aber erneut mit ‚Primer-484‘ nicht mehr existent. Stattdessen starteten 5'-Enden an den Nukleotidpositionen -595 und -652. In mC wurden zusätzlich Signalbanden bei -618 und -640 relativ zum *rpoB*-Startkodon detektiert. All diese 5'-Transkripte waren nur

sehr schwach abundant und wiesen keine für PEP bzw. NEP promotorähnliche Sequenzmotive auf (in Abbildung 3.24 mit einem grauen Dreieck gekennzeichnet).

In den transplastomen Pflanzen mC und mE war das *aadA*-Gen mit den regulatorischen Sequenzen am 5'- und 3'-Ende (Legen, 2002) in die *Sma*I-Restriktionsschnittstelle 343 bp stromaufwärts des *rpoB*-core-Promotormotivs inseriert worden. Der Promotor der Resistenzkassette (16S-Promotor) zeigte in Richtung des *trnC*(GCA)-Gens und damit entgegengesetzt zur Transkriptionsrichtung von *PrpoB*-344 (Abbildung 3.21). Dennoch wäre es möglich, dass NEP und/oder PEP vielleicht Sequenzen in der Resistenzkassette stromaufwärts von -344 als Promotorstrukturen erkennen, wodurch die Transkription von *rpoB* gewährleistet wäre. Um diese Frage zu klären, wurde die Suche nach putativen Promotoren auf die Resistenzkassette ausgeweitet. Neben dem Wildtyp wurden auch die *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten NtSH-6.2 (*PrpoB*_{227/+399}) und NtSH-7.14 (*PrpoB*_{28/+399}) als Kontrollen verwendet (Kapitel 3.3). Sie enthalten wie mC und mE die gleiche *aadA*-Kassette mit dem 16S-Promotor, mit dem Unterschied, dass sie stromabwärts vom Transgen in der gleichen Transkriptionsrichtung liegt. So sollten mögliche Promotoren in der Resistenzkassette von mC und mE auch in der Kassette der *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten vorkommen.

Mit dem in der *aadA*-Kassette liegenden ‚Primer-702‘ konnten in beiden Mutanten 5'-Transkriptenden, die an den Nukleotidpositionen -867 und -780/2 innerhalb des 16S-Promotors terminierten, detektiert werden. In deren Umgebung wurden jedoch keine bekannten promotorähnlichen Strukturen gefunden. Demnach resultieren die 5'-Enden möglicherweise aus Prozessierungsereignissen. In der Tat wurden weiter stromaufwärts in der *aadA*-Sequenz GAGCCGTACAAATGTACCGGCCAGCAACGTC an den Nukleotidpositionen -914 (G) und -921 (T) putative Transkriptionsstartstellen detektiert. Wie erwartet, fehlten 5'-Enden im Wildtyp, waren aber auch nicht in den beiden *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten NtSH-6.2 und NtSH-7.14 präsent. Folglich handelt es sich bei der bidirektionalen Transkription des 16S-Promotors um eine für mC und mE spezifische Beobachtung.

3.4.3.2 Identifizierung von Transkriptionsinitiationsstartstellen mittels 5'-RACE

Im Gegensatz zur *Primer Extension*-Methode erlaubt die 5'-RACE-Technik die Unterscheidung zwischen primären und prozessierten 5'-Transkriptenden. Diese Technik wurde erstmals von Bensing et al. (1996) beschrieben. Seitdem wird sie benutzt, um 5'-

Primärtranskripte in verschiedenen Gruppen von Bakterien (Argaman et al., 2001; Vogel et al., 2003) und in Organellen (Miyagi et al., 1998; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007; Kühn et al., 2005) zu detektieren. Die Herleitung von Prozessierungs- und Initiationsstellen ist im Kapitel 2.2.4.9 detailliert beschrieben (Abbildung 2.3). Zusammengefasst besitzen in Bakterien wie in Mitochondrien und Plastiden primäre Transkripte Triphosphate, prozessierte Transkripte hingegen Monophosphate an ihren 5'-Enden. Lediglich Letztere dienen als Substrat für die RNA-Ligase und werden selektiv an ein RNA-Oligonukleotid mit bekannter Sequenz (RNA-Linker) ligiert. Es folgt eine Reverse Transkription und PCR mit dem reversen Primer und dem Linker-Primer am 5'-Ende. Demnach werden primäre 5'-Enden nur nach Entfernung ihrer Triphosphate durch eine *tobacco acid pyrophosphatase* (TAP) ligiert. Die 5'-RACE-PCR aus TAP-behandelter RNA bringt folglich Produkte von sowohl primären als auch prozessierten Transkripten hervor. Keine TAP-Behandlung an Primärtranskripten dient als Negativkontrolle, da Produkte von primären Transkriptenden signifikant reduziert sind oder fehlen. Der Vergleich von 5'-RACE-Produkten aus TAP-behandelter und TAP-unbehandelter RNA identifiziert auf diese Weise Primärtranskripte.

3.4.3.3 Korrekte Initiation der Transkription in vivo an *PrpoB*-344/3 im Tabak-Wildtyp

Die Sequenzierung der TAP-RACE-Klone zeigte für den Tabak-Wildtyp, die Kontrollmutante mE sowie die PEP-defiziente *ΔrpoA*-Mutante die Initiation der Transkription an den Positionen -344 und -343 relativ zur Translationsinitiationsstelle. In der Mutante mC erfolgte hingegen keine Transkriptionsinitiation. (Abbildung 3.25). Damit wurde das Ausschalten des *rpoB*-Promotors in mC verifiziert. Im Folgenden werden die Transkriptionsstartpunkte und die sie umgebenden Sequenzen als mögliche Promotoren in Tabak-Plastiden mit dem Buchstaben P („Promotor“) benannt, gefolgt vom Gennamen und der Position des initiierenden Nukleotid bezüglich zum Startpunkt der kodierenden Sequenz, z.B. *PrpoB*-344/3.

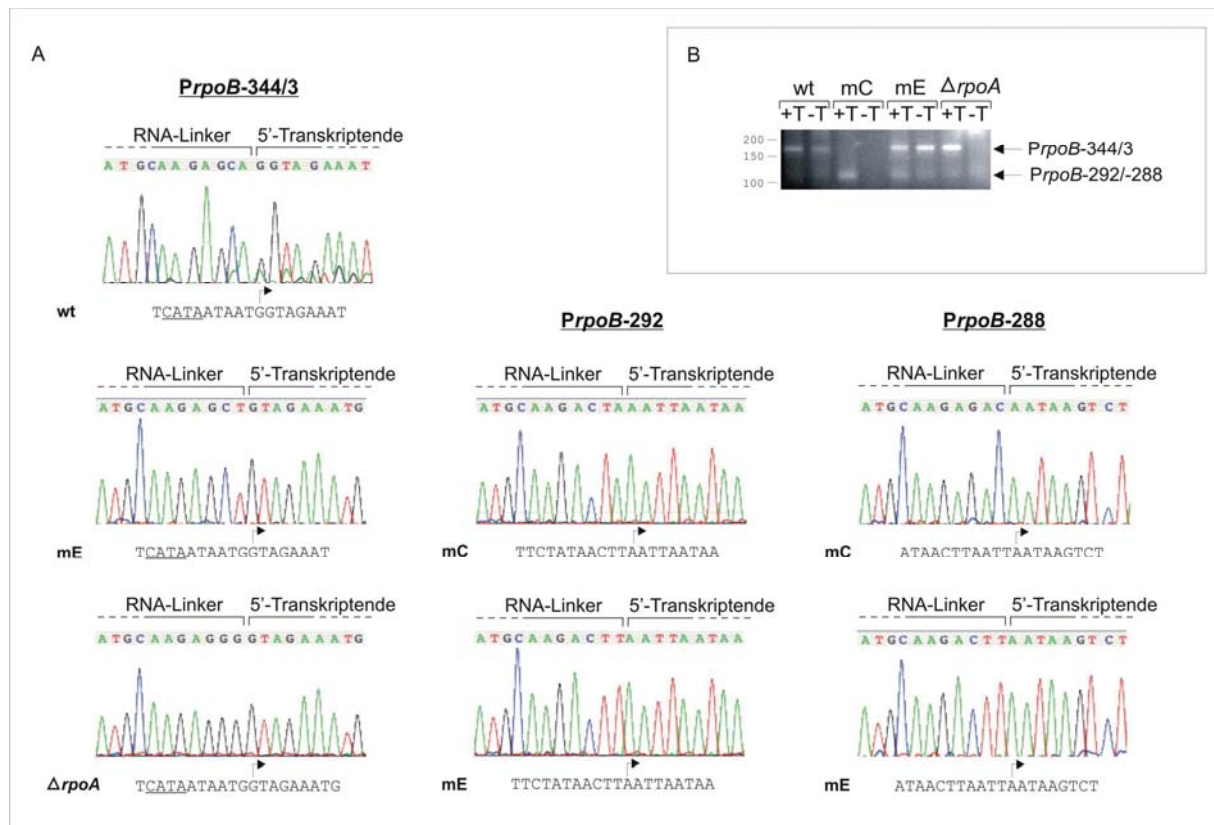


Abbildung 3.25: Korrekte Transkriptionsinitiation an *PrpoB*-344/3 im Tabak-Wildtyp. (A) Das Chromatogramm zeigt eine typische Sequenz an der Ligationstelle klonierter 5'-RACE-Produkte mit RNA-Linker und 5'-Transkriptende. Unterhalb des Chromatogramms ist die plastidäre Promotorsequenz *PrpoB*-344/3 dargestellt. Der *in vivo* detektierte Transkriptionsinitiationsort ist durch einen gebogenen Pfeil gekennzeichnet. (B) 5'-RACE-Analyse *in vivo* synthetisierter *rpoB*-Transkripte (Kap. 2.2.4.9). Die PCR-Produkte wurden parallel zu einem DNA-Längenstandard (nicht angezeigt; Angaben in bp) in Agarosegelen aufgetrennt, kloniert und sequenziert. Das TAP-spezifische RT-PCR-Produkt (+T), das mit dem 5'-Ende primärer *rpoB*-Transkripte korrespondiert, ist durch eine Pfeilspitze und den dazugehörigen Promotornamen in Bezug auf die Translationsinitiationsstelle (+1) gekennzeichnet. Als Kontrolle diente ein paralleler 5'-RACE-Ansatz in TAP-Puffer ohne TAP-Behandlung (-T). Die PCR-Fragmente enthalten zusätzlich 28 bp des RNA-Linkers.

Unabhängig von der TAP-Behandlung der RNAs aus Wildtyp und Kontrollmutante mE wurden Transkripte identifiziert, die an denselben Nukleotiden starten (Abbildung 3.26). Folglich tragen beide 5'-Enden 5'-Monophosphate und resultieren trotz des perfekten CATA-Motivs für NEP-Promotoren vom Typ I stromaufwärts von *PrpoB*-343/4 aus Prozessierungsereignissen. Alternativ könnte es sich auch um eine gemischte Population von primären und prozessierten 5'-Transkriptenden handeln, die an identischen Nukleotiden initiieren, aber entweder Tri- oder Monophosphate tragen. Zudem war in der *ΔrpoA*-Mutante die NEP-Initiationsstelle *PrpoB*-344/3 nur in den 5'-RACE-Produkten aus TAP-behandelter RNA zu erkennen. Damit ist eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Transkriptionsinitiation an -344/3 auch im Wildtyp und mE gegeben. Eine eindeutige Bestimmung von Primärtranskripten ist allerdings nur mit einer zusätzlichen Methode der *ribonuclease protection of in vitro-capped transcripts* möglich.

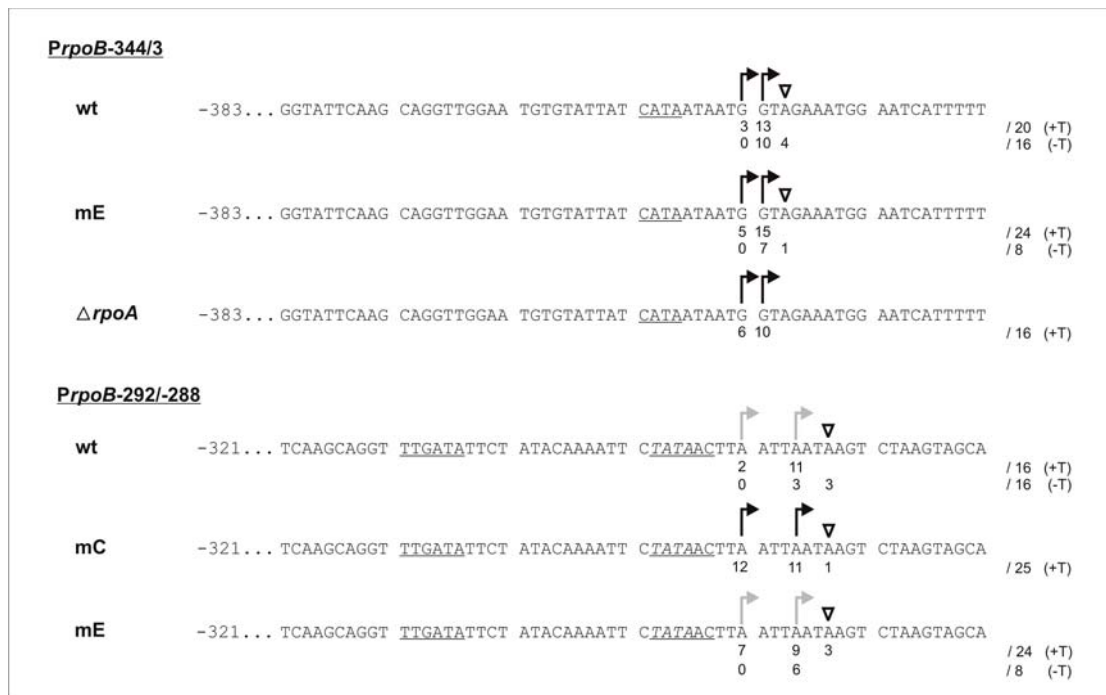


Abbildung 3.26: 5'-Transkriptenden detektiert mittels Klonierung und Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte mit den Bezeichnungen *PrpoB*-344/3 und *PrpoB*-292/-288 in Abbildung 3.25. Gezeigt sind *PrpoB*-344/3 für Wildtyp (wt), die Mutanten mE und $\Delta rpoA$ sowie *PrpoB*-292/-288 für wt, mC und mE. Ausschnitte der Sequenzen um die Transkriptionsstartpunkte herum und davon stromaufwärts sind gezeigt. Die Zahlen am Sequenzanfang geben die Positionen der ersten Nukleotide bezogen auf die Translationsstartpunkte an. Die Zahlen unter den Nukleotidpositionen geben die Anzahl der Klone an, für die die 5'-Transkriptenden mit den entsprechenden Positionen detektiert wurden (T+ Reihe: Klonnummern der 5'RACE-Produkte aus der TAP-Behandlung; T- Reihe: Klonnummern der 5'RACE-Produkte ohne TAP-Behandlung). Die Zahlen hinter den Schrägstrichen geben die Gesamtanzahl an sequenzierten Klonen an. Nukleotide, die höchstwahrscheinlich den 5'-Enden aus Prozessierungsereignissen entsprechen, sind mit einem Dreieck gekennzeichnet. Transkriptionsstartstellen aus TAP-spezifischen 5'-RACE-Produkten sind mit einem gebogenen, schwarzen Pfeil angegeben. Für Nukleotide mit einem gebogenen, grauen Pfeil ist die Identifizierung nicht eindeutig. Das Herleiten von Prozessierungs- und Initiationsstellen ist im Kapitel 2.2.4.9 detailliert beschrieben.

Neben *PrpoB*-344/3 initiierten in mC Transkripte an den zwei Nukleotidpositionen -292 und -288 relativ zum *rpoB*-Startkodon. Die Sequenz zeigte direkt vor *PrpoB*-292/-288 sowohl ein Promotorkonsensusmotiv TATA von NEP-Typ-I-Promotoren (Abbildung 3.26; Nukleotide sind kursiv) als auch potentielle -35/-10-Motive von einem PEP-Promotor (Nukleotide sind unterstrichen). Möglicherweise ist *PrpoB*-344/3 nicht essentiell für die Transkription von *rpoB* und es kommt aufgrund des fehlenden NEP-Promotors (*PrpoB*-343/4) in mC zu einem Umschalten von NEP- auf PEP-Transkription und somit zur Autoregulation der PEP-Expression. Alternativ könnte auch NEP die Transkription an -292/288 initiieren. Im Wildtyp und mE scheinen die 5'-Transkripte hingegen vielmehr aus Prozessierungsereignissen zu resultieren, da sowohl in der +TAP- als auch -TAP-Probe das 110 bp-Fragment gleich stark amplifiziert wurde (Abbildung 3.25). Trotz des gleichen Bandenmusters zeigte die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte von Wildtyp und mE eine deutliche Anreicherung dieser 5'-Enden in den TAP-behandelten Proben (Abbildung 3.26; *PrpoB*-

292/288). Von den 16 TAP-RACE-Klonen aus den TAP-unbehandelten RNAs des Wildtyps starteten hingegen nur drei 5'-Transkripte an der Position -288 bzw. -285. Für die mE-Mutante initiierten sechs von acht 5'-Transkriptenden an der Position -288. Möglicherweise wird wie in mC auch im Wildtyp und in mE die Transkription an den Nukleotidpositionen -292 und -288 initiiert, wobei die prozessierten 5'-Enden und die Primärtranskripte an identischen Nukleotiden starten. In der +TAP- und -TAP-Probe der PEP-defizienten *ΔrpoA*-Mutante wurde das gleiche 110 bp-Fragment amplifiziert. Für den Fall eines Primärtranskripts scheint die transkriptionelle Aktivität doch nicht von PEP, sondern von einem kernkodierten Enzym (NEP) vermittelt zu werden.

3.4.3.4 Identifizierung neuer putativer Transkriptionsstartpunkte mittels 5'-RACE

Mit dem Ziel weitere Promotoren von *rpoB* zu identifizieren, wurde dessen 5'-UTR mit mehreren reversen Primern stromaufwärts des identifizierten Transkriptionsstarts (*PrpoB*-344/343) mittels 5'-RACE analysiert, bis keine weiteren Transkriptenden mehr detektiert werden konnten. In Tabelle 2.4 sind die zur Analyse verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Die Charakterisierung des *rpoB* 5'-Endes zeigte zwei weitere Transkriptionsstartstellen an den Positionen -558 und -618 (Abbildung 3.27A). Die *PrpoB*-618 Initiationsstelle war sowohl im Wildtyp als auch in den beiden Mutanten mC und mE als 163 bp-Fragment detektierbar. Obwohl auch die gleichen PCR-Produkte von TAP-unbehandelten RNAs zu beobachten waren, zeigte die Sequenzanalyse der klonierten PCR-Produkte, dass unter den Produkten mit den gleichen Längen die 5'-Enden deutlich (mC, mE) oder ausschließlich (wt) in den TAP-behandelten Proben präsent waren (Abbildung 3.28). Das Sequenzmotiv TATA stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle *PrpoB*-618 könnte als NEP-Promotor vom Typ I klassifiziert werden. Im Fall von *PrpoB*-558 zeigte die 5'-RACE-PCR-Analyse der +TAP-Probe von mC und mE ein deutlich sichtbares Fragment von 103 bp. Im Wildtyp war dagegen nur ein schwaches Amplifikationsprodukt zu erkennen. Aufgrund des direkt stromaufwärts liegenden Sequenzmotivs CGTA wird *PrpoB*-558 der Gruppe der NEP-Typ-I-Promotoren zugeschrieben. Die 5'-Transkriptenden aus der -TAP-Probe initiierten an Position -545 relativ zur Translationsstartstelle (Abbildung 3.28). Für mC konnte in wenigen Klonen dieses kürzere 5'-Ende (90 bp-Fragment) auch in der +TAP-Probe detektiert werden, was auf eine schnelle Prozessierung des putativen Primärtranskripts schließen lässt.

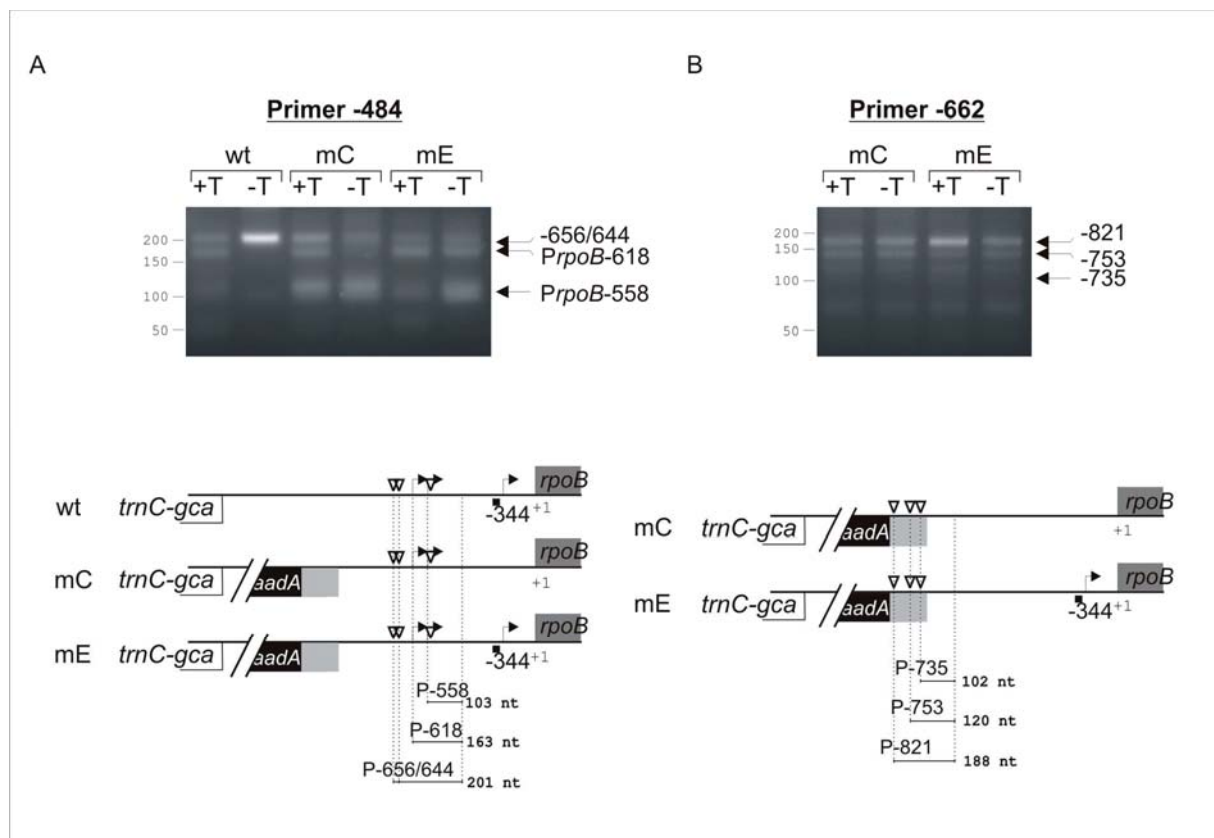


Abbildung 3.27: 5'-RACE-Analyse stromaufwärts von *PrpoB*-344/3. Zur Identifizierung neuer, putativer Transkriptionsstartpunkte wurde die 5'-RACE-Analyse auf die *rpoB* 5'-UTR stromaufwärts von *PrpoB*-344/3 erweitert: (A) Primer -484 und (B) Primer -662. Die PCR-Produkte wurden parallel zu einem DNA-Längenstandard (nicht angezeigt; Angaben in bp) in Nusieve-Agarosegelen aufgetrennt, kloniert und sequenziert. Das TAP-spezifische RT-PCR-Produkt (+T), das mit dem 5'-Ende von primären *rpoB*-Transkripten korrespondiert, ist durch eine Pfeilspitze und den Promotornamen, von prozessierten *rpoB*-Transkripten mit dem Abstand in nt in Bezug auf die Translationsinitiationsstelle (+1) gekennzeichnet. Als Kontrolle diente ein paralleler 5'-RACE-Ansatz in TAP-Puffer ohne TAP-Behandlung (-T). Die PCR-Fragmente enthalten zusätzlich 28 bp des RNA-Linkers. Die Diagramme unter (A) und (B) zeigen die *rpoB* 5'-UTR. Die Größen der erwarteten RT-PCR-Produkte aus der 5'-RACE-Analyse mit dem Primer -484 sowie Primer -662 sind in Nukleotiden angegeben. Der *rpoB*-Promotor von Tabak (*PrpoB*-344/3) ist durch ein schwarzes Rechteck, der Transkriptionsinitiationsort mit einem gebogenen Pfeil markiert.

Des Weiteren wies die 5'-RACE-PCR-Analyse der *rpoB* 5'-UTR vom Wildtyp sowie von mC und mE ein Fragment um ca. 200 bp vor. Gemäß der Sequenzanalyse starteten die 5'-Enden an zwei unterschiedlichen Positionen -656 und -644. Da die 5'-Enden in allen drei Fällen sowohl in der +TAP- als auch -TAP-Probe zu finden waren, resultieren sie nicht aus einer Transkriptionsinitiation, sondern vielmehr aus der Prozessierung eines weiter stromaufwärts initiierten Primärtranskripts.



Abbildung 3.28: 5'-Transkriptenden detektiert mittels Klonierung und Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte mit den Bezeichnungen *PrpoB*-618 und *PrpoB*-558 in Abbildung 3.27A. Gezeigt sind putative Transkriptionsinitiationsstartpunkte sowie prozessierte 5'-Enden für Wildtyp (wt) sowie die Mutanten mC und mE. Ausschnitte der Sequenzen um die Transkriptionsstartpunkte herum und davon stromaufwärts sind gezeigt. Die Zahlen am Sequenzanfang geben die Positionen der ersten Nukleotide bezogen auf die Translationsstartpunkte an. Die Zahlen unter den Nukleotidpositionen geben die Anzahl der Klone an, für die die 5'-Transkriptenden mit den entsprechenden Positionen gefunden wurden (T+ Reihe: Klonnummern der 5'RACE-Produkte aus der TAP-Behandlung; T- Reihe: Klonnummern der 5'RACE-Produkte ohne TAP-Behandlung). Die Zahlen hinter den Schrägstrichen geben die Gesamtanzahl an sequenzierten Klonen an. Nukleotide, die höchstwahrscheinlich den 5'-Enden aus Prozessierungsereignissen entsprechen, sind mit einem Dreieck gekennzeichnet. Transkriptionsstartstellen aus TAP-spezifischen 5'-RACE-Produkten sind mit einem gebogenen Pfeil angegeben. Das Herleiten von Prozessierungs- und Initiationsstellen ist im Kapitel 2.2.4.9 detailliert beschrieben.

Die 5'-RACE-Analyse mit einem an Position -662 startenden reversen Primer führte jedoch zu keiner weiteren Identifizierung von primären 5'-Transkriptenden. Stattdessen waren die drei PCR-Produkte, die sich aus den 5'-Enden an den Positionen -735, -753 und -821 herleiteten, nach der Amplifizierung der TAP-behandelten und TAP-unbehandelten RNAs gleich stark abundant (Abbildung 3.29A). Die Transkripte starteten an den Nukleotiden (mit einem Dreieck in Abbildung 3.29B gekennzeichnet) unabhängig von der Behandlung mit TAP. Folglich trugen die drei 5'-Enden 5'-Monophosphate und stammten aus Prozessierungsereignissen. Damit übereinstimmend wurden keine bekannten Sequenzmotive weder für PEP noch für NEP-Promotoren gefunden. Zusätzliche Transkriptionsstartstellen wurden nicht mit weiter stromaufwärts von *rpoB* 5'-UTR positionierten Primern detektiert.

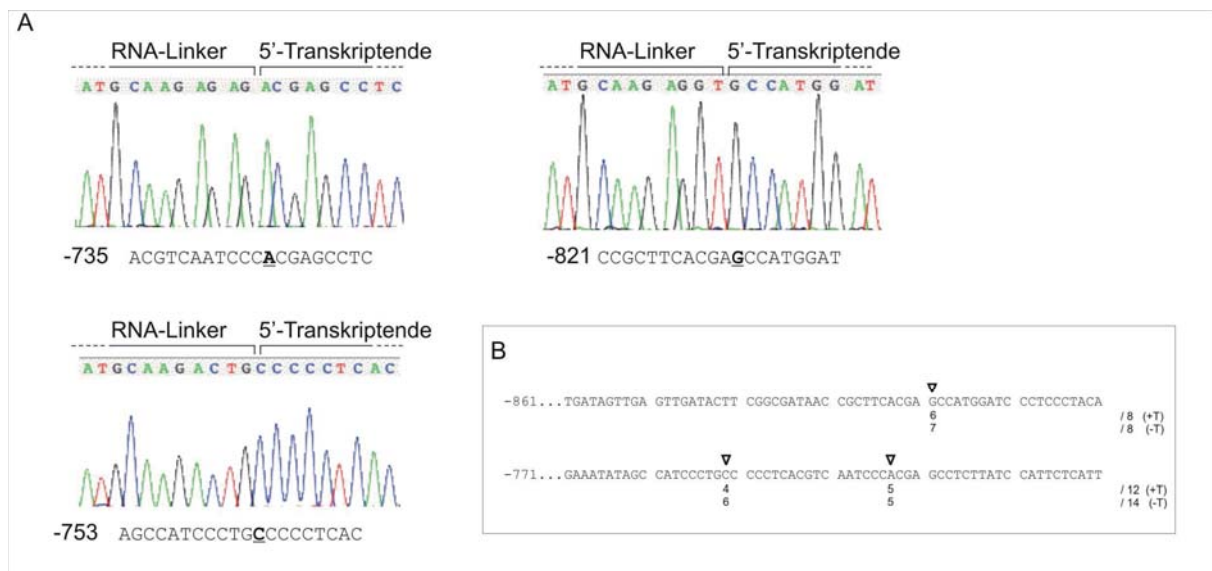


Abbildung 3.29: 5'-Transkriptenden detektiert mittels Klonierung und Sequenzierung der 5'-RACE-Produkte aus Abbildung 3.27B. (A) Identifikation der 5'-Enden mittels Sequenzierung über die Ligationsstelle hinweg. Die Chromatogramme zeigen typische Sequenzen an den Ligationsstellen klonierter 5'-RACE-Produkte mit RNA-Linker und 5'-Transkriptende. Sequenzausschnitt vom RNA-Linker und Transkript sind angegeben. Unterhalb des Chromatogramms ist die plastidäre Sequenz dargestellt. Das fett gedruckte, unterstrichene Nukleotid entspricht dem prozessierten *rpoB* 5'-Transkriptende. (B) Gezeigt sind die 5'-Transkriptenden für die Mutanten mC und mE, gewonnen aus Klonierung und Sequenzierung. Die Zahlen am Sequenzanfang geben die Positionen der ersten Nukleotide bezogen auf die Translationsstartpunkte an. Die Zahlen unter den Nukleotidpositionen geben die Anzahl der Klone an, für die die 5'-Transkriptenden mit den entsprechenden Positionen gefunden wurden (T+ Reihe: Klonnummern der 5'RACE-Produkte aus der TAP-Behandlung; T-Reihe: Klonnummern der 5'RACE-Produkte ohne TAP-Behandlung). Die Zahlen hinter den Schrägstrichen geben die Gesamtanzahl an sequenzierten Klonen an. Nukleotide, die höchstwahrscheinlich den 5'-Enden aus Prozessierungsereignissen entsprechen, sind mit einem Dreieck gekennzeichnet. Das Herleiten von Prozessierungs- und Initiationsstellen ist im Kapitel 2.2.4.9 detailliert beschrieben.

Zusammengefasst bestätigten *Primer Extension*- und 5'-RACE-Analysen die Nutzung des zuvor *in vitro* charakterisierten *rpoB*-Promotors (*PrpoB*-345) *in vivo*. Die Punktmutation im *core*-Promotormotiv führte zum Ausschalten desselben. Darüber hinaus wurden weitere 5'-Enden detektiert. Unter ihnen lassen drei 5'-Transkriptenden bisher unbekannte, putative Transkriptionsinitiationsstellen in der *rpoB* 5'-UTR von Wildtyp sowie den Mutanten mC und mE vermuten (-292/-288, -558/6, -618 relativ zum *rpoB*-Startkodon). Sequenzanalysen identifizierten PEP- und NEP-Promotormotive. Womöglich gewährleisten sie zusätzlich zu *PrpoB*-345 die *rpoB*-Expression. Es bleibt allerdings zu überprüfen, ob sie tatsächlich für die *rpoB*-Transkription *in vivo* Relevanz besitzen. Weiterhin initiierten prozessierte 5'-Enden innerhalb der *aadA*-Resistenzkassette, was auf die Nutzung von weiter stromaufwärts liegenden *aadA*-spezifischen Sequenzen durch PEP und/oder NEP hindeutet. Aber erst die Kombination aus *Primer Extension*, 5'-RACE-Technik und *ribonuclease protection assays* ermöglicht die Unterscheidung von primären und prozessierten 5'-Transkriptenden und somit die eindeutige Identifizierung von Transkriptionsinitiationsstellen.

4 DISKUSSION

4.1 Cytokinineinfluss auf die Transkription in den Chloroplasten

Cytokinine sind während des Pflanzenwachstums in fast alle Entwicklungs- und physiologische Prozesse involviert und üben viele ihrer Funktionen in meristematischen Geweben junger Pflanzen aus. Sie scheinen eine Vielzahl Licht-regulierter Prozesse wie De-Etiolierung und Chloroplastenentwicklung/-differenzierung zu vermitteln (Überblick in Mok und Mok, 2001). Cytokinine können außerdem den Verlust von Blattchlorophyll und damit Seneszenzerscheinungen verzögern (Zavaleta-Mancera et al., 1999b; Gan und Amasino, 1995; McKenzie et al., 1998; Lim et al., 2007). Demnach scheinen gerade Plastiden Zielorte für Cytokininaktionen zu sein. Darüber hinaus könnte die Wirkung der Cytokinine sich auch auf die plastidäre Genexpression erstrecken. Dafür sprechen Studien, die einen positiven Effekt von BA auf die plastidäre mRNA-Population beschreiben (Brenner et al., 2005; Kasten et al., 1997; Lerbs et al., 1984; Colijn et al., 1982; Seyer und Lescure, 1984). Ob Cytokinin tatsächlich einen Einfluss auf die Transkriptstabilität ausübt oder ob die erhöhten Transkriptmengen Folge erhöhter Transkriptionsraten sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden (Zubo et al., 2008). Trotz der wichtigen Rolle von Cytokinin in der Regulation der Chloroplastenbiogenese (Kasahara et al., 2004), gibt es zudem erst wenige Hinweise über ihre potentielle Rolle in der Kontrolle der Transkription einzelner Chloroplastengene (Überblick in 1994; Mok und Mok, 2001; Zubo et al., 2008). Erschwert wird die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der Cytokininaktionen in den Plastiden durch die in Studien verwendeten unterschiedlichen Pflanzenarten und Wachstumsbedingungen und die daraus resultierenden, z.T. widersprüchlichen, Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Serie von Experimenten durchgeführt, um den Einfluss von Cytokinin auf die Transkription und Transkriptakkumulation von Chloroplastengenen in den dikotylen Pflanzen *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) unter Berücksichtigung des Entwicklungsstadiums der Pflanze, der Pflanzenspezies, des endogenen Cytokiningehalts sowie der kernkodierten Komponenten der plastidären Transkription zu untersuchen.

4.1.1 Auf *run-on*-Assays basierende Transkriptionsanalysen in Plastiden

Transkriptionsraten einzelner Plastidengene können durch Hybridisierung markierter *run-on*-Transkripte auf *Dot Blot* Arrays bestimmt werden. Die Analyse von Array-basierten Transkriptionssprofilen in Plastiden stellt im Vergleich zu nukleären Expressionsprofilen eine

Herausforderung dar. So kann die Transkription einzelner Gene eines Operons von mehreren, auch intracistronischen, Promotoren erfolgen (Orozco et al., 1990; Kapoor et al., 1994; Hajdukiewicz et al., 1997). Des Weiteren sind Gene auf plastidären Chromosomen auf beiden DNA-Strängen lokalisiert. Folglich erlaubte die *run-on*-Methode nicht die Bestimmung von Strang-spezifischer Transkription, da im Fall von *run-on*-Transkripten die Sonden Transkripte von beiden DNA-Strängen einschließen. Außerdem resultieren die *run-on*-Transkripte zum Zeitpunkt der Chloroplastenisolation nicht aus der Transkriptionsinitiation, sondern aus der Elongation von RNA-Molekülen an initiierten Transkriptionskomplexen. Zwar kann mit diesem Assay-System Transkriptionsinitiation nicht ausgeschlossen werden, der Beitrag von Transkripten aus solchen Ereignissen sollte jedoch nur einen kleinen Prozentsatz der gesamten *run-on*-Transkripte darstellen.

4.1.2 Transkriptions- und Transkriptanalyse von BA-behandelten Pflanzen

Die *run-on*-Transkriptionsassays zeigten für die jungen und alten Pflanzen ein unterschiedliches Antwortmuster auf Cytokinin. So war der positive Effekt von exogenem BA auf die Transkription bestimmter Chloroplastengene in seneszenten Tabakblättern nach 3 h (Abbildung 3.2), in sieben-Tage-alten Tabak- und Arabidopsis-Pflanzen bereits nach 2 h zu beobachten. (Abbildungen Abbildung 3.5 und Abbildung 3.11). Der grundlegende Unterschied zwischen seneszenten Blättern und sieben-Tage-alten Pflanzen ist das Entwicklungsstadium ihrer Zellen. Die hier verwendeten 12-Wochen-alten Tabakpflanzen zeigten beginnenden Chlorophyllabbau in den Blättern. Mit fortschreitender (Blatt-)Seneszenz kommt es zur Degradation der Chloroplasten und ihrer Komponenten sowie zu einer verlangsamten Transkriptionsrate, welche mit der Abnahme der photosynthetischen Aktivität und womöglich verminderten Sensitivität gegenüber Hormonen einhergeht (Krupinska und Humbeck, 2004; Noodén et al., 1997; Jiang et al., 1993; Lim et al., 2003; Baumgartner et al., 1989; Zubo et al., 2008). Aus diesem Grund kann hier im Fall des seneszenten Tabaks von einer im Vergleich zu den jungen Pflanzen verringerten basalen Transkriptionsaktivität und Hormonsensitivität der Blätter ausgegangen werden. Vor dem Hintergrund vermehrt auftretender, auch von Cytokinin induzierten Zellteilungen in jungen Pflanzen sind in diesem Entwicklungsstadium die Zellen und vielleicht ihre Chloroplasten im Vergleich zum seneszenten Tabak cytokininsensitiver und antworten somit schneller auf die BA-Behandlung. Im Gegensatz zum seneszenten Tabak führte die zweistündige BA-Applikation der jungen Pflanzen zu der schon allgemein hohen plastidären Transkriptionsaktivität zu diesem Zeitpunkt zu einer weiteren Steigerung der Transkription (siehe Anhang: A 3 und A 4). Im Einklang damit zeigten auch Zubo et al. (2008) eine deutlich weniger effiziente Aktivierung

der Chloroplastentranskription durch Cytokinin im apikalen Teil von abgeschnittenen Blättern 22-Tage-alter Gerste als im gleichen Blattabschnitt 9-Tage-alter Pflanzen. In diesem Zusammenhang hatte auch die interne ABA/CK-Ratio womöglich einen Einfluss auf das unterschiedliche Antwortzeitfenster auf BA in seneszentem Tabak und jungen Pflanzen. Starklicht induziert die Akkumulation von Abscisinsäure – Cytokininantagonist der Pflanzenentwicklung und Chloroplastenbiogenese (ABA, Weatherwax et al., 1996; Symons und Reid, 2003; Kusnetsov et al., 1998; Kulaeva et al., 2002; Khokhlova et al., 1978; Koiwai et al., 2004; Yang et al., 2002a; Nooden, 1988a). Der Antagonismus in den Effekten von ABA und Cytokinin hängt dabei vom Konzentrationsverhältnis beider Pflanzenhormone ab. Die 24 h-Prä-Inkubation der Gerstenblätter in Wasser und Starklicht führte zu einer erhöhten ABA/CK-Ratio – möglicherweise hervorgerufen durch Stressfaktoren wie Blattabschnitt und/oder konstante Illumination (Zubo et al., 2008). In sieben-Tage-alten Pflanzen kann aufgrund des Alters und fehlender Stressfaktoren (konstantes Starklicht, Blattabschnitt) eine zugunsten der Cytokininmenge verringerte ABA/CK-Ratio angenommen werden. Vielleicht wurde sie sogar durch einen BA-induzierten Anstieg der endogenen Zeatinmengen hervorgerufen, der in eine schnellere Aktivierung von Plastidengen resultierte (nach 2 h BA-Zufuhr). So konnte in Tabakgewebekulturen eine Zunahme von Zeatin durch exogenes BA beobachtet werden (Hansen et al., 1987). Demnach scheint das Antwortzeitfenster auf die Cytokininbehandlung vom Alter der Zellen bzw. vom physiologischen Zustand ihrer Chloroplasten abzuhängen. Möglicherweise wird dabei die plastidäre Genexpression von der internen ABA/CK-Ratio beeinflusst. Die im Vergleich zum Tabak-Wildtyp deutlich reduzierte plastidäre Transkriptionsaktivität in der cytokinindefizienten *35S::AtCKX2*-Tabakpflanze (*Nta::AtCKX2*; Abbildung 3.7) unterstützt nicht nur die Hinweise auf einen potentiellen Einfluss von Cytokinin auf die Chloroplastenbiogenese, sondern auch auf die Chloroplastentranskription. Interessanterweise fand die Aktivierung der Gene durch BA (30 min nach BA-Behandlung; Abbildung 3.8) zu einem deutlich früheren Zeitpunkt als in den jungen Arabidopsis- und Tabakpflanzen statt (2 h nach BA-Applikation, Abbildung 3.2 und Abbildung 3.5). Möglicherweise besitzen die cytokinindefizienten Pflanzen aufgrund der konstitutiv veränderten Plastidenmorphologie und des reduzierten Cytokiningehalts (Werner et al., 2008) ein sensitiveres Cytokinin-signaltransduktionssystem, um so den verringerten Cytokiningehalt zu kompensieren.

Entwicklungsspezifische, Cytokinin-responsive Komponenten der Signaltransduktion könnten die Regulation der plastidären Transkription vermitteln. In einer jüngeren Studie wurde eine in den Chloroplasten von Arabidopsis lokalisierte Sensor-Histidin-Kinase (CSK, *chloroplast sensor kinase*) beschrieben. Die Sequenz sowie die funktionellen und phylogenetischen

Eigenschaften der CSK mit der Hik2-ähnlichen, cyanobakteriellen Sensor-Kinase lassen darauf schließen, dass CSK als Sensor innerhalb eines Zwei-Komponenten-Redox-Regulationssystems Photosynthese und plastidäre Genexpression miteinander verbindet (Puthiyaveetil et al., 2008). Es wäre daher spannend zu untersuchen, welche Rolle CSK in der Cytokinin-signaltransduktion spielt. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss von möglichen entwicklungsabhängigen, Cytokinin-regulierten Transkriptionsfaktoren (z.B. Sigmafaktoren der PEP) analysiert werden (Lysenko, 2007). Eine erste Analyse des putativen, Cytokinin-regulierten plastidären Transkriptionsfaktors PEND (*plastid envelope DNA binding*) wurde in dieser Arbeit in Arabidopsis durchgeführt. Das Protein scheint als eine Untereinheit von TAC (*transcriptionally active chromosome*, plastidäre Proteinpräparation von PEP) das Plastom an die innere Membran anzuheften und auf diese Weise in die Regulation der plastidären Genexpression involviert zu sein (Sato et al., 1998; Sato und Ohta, 2001; Wycliffe et al., 2005). Die zwei- bis dreifachen Steigerungen der PEND-Transkripte 15 min bzw. 120 min nach Cytokininbehandlung lassen auf eine Beteiligung sowohl in der frühen Cytokininantwort als auch direkten Aktivierung der Chloroplastentranskription in Arabidopsis schließen (Abbildung 3.12B). Interessant wäre zu untersuchen, ob für dieses Gen auch ein entwicklungsabhängiges Transkriptmuster zu beobachten ist. PEND ist aber nur einer von mehreren vielversprechenden Kandidaten für Cytokinin-regulierte, in Plastiden lokalisierte Transkriptionsfaktoren. Mittels Microarrayanalysen wurden in den letzten Jahren immer mehr solcher Faktoren entdeckt, die entweder von BA hochreguliert (at1g21910, at1g68840, at1g68840, at1g75390, at3g18650, at5g27580, at5g52020, at5g65590) oder runterreguliert werden (at1g64860, at1g68880, at2g22200, at2g39100, at2g42380, at2g42980, at3g59040, at3g59080, at4g34590, at5g39810; TAIR, *The Arabidopsis Information Resource Homepage*). Hier liegt noch ein spannendes Feld für die Analyse des Einfluss von Cytokinin-regulierten Transkriptionsfaktoren auf die Transkription in den Chloroplasten (siehe auch Kapitel 4.2.1). Neben Komponenten der Signaltransduktion und Transkriptionsfaktoren wird der Cytokinineffekt auf die Genexpression in den Chloroplasten möglicherweise auch durch hormonelle Interaktionen mit Cytokinin-bindenden Proteinen vermittelt (Kulaeva et al., 2000; Lukevich et al., 2002).

Das entwicklungsspezifische Antwortzeitfenster spiegelte sich auch auf Transkriptebene wider. Während aber BA deutlich die Transkriptsynthese beeinflusst, verursacht die Cytokininbehandlung auf Transkriptebene keine großen Änderungen. Das deutet darauf hin, dass die vorhandenen mRNA-Mengen trotz von exogen induzierter Erhöhung des internen Cytkiningehalts innerhalb der Zelle stabil gehalten werden, um auf diese Weise Funktion und

Biogenese der Chloroplasten aufrechtzuerhalten. Solch eine zelluläre Homöostase ist für einige Stressfaktoren wie Hitze, Kälte, Trockenheit, ABA-Behandlung beschrieben worden und ist für jede Pflanzenart unterschiedlich (Larkindale und Vierling, 2008; Levitt, 1972; Jenks und Hasegawa, 2005; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki, 2006; Chawade et al., 2007; Khandelwal et al., 2008; Ghassemian et al., 2008).

Die Transkriptstabilitäten von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* scheinen je nach Entwicklungszustand bzw. endogenem Cytokiningehalt der Blätter/Pflanzen im Verlauf der BA-Behandlung zeitlich versetzt zu- bzw. abzunehmen. Allen gemein sind die verringerten Transkriptstabilitäten von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* vor der transkriptionellen Aktivierung durch BA. Möglicherweise lösten die verringerten mRNA-Mengen die Induktion der Transkription aus. Das könnte darauf hindeuten, dass Cytokinin neben dem direkten Einfluss auf die Transkription auch über die Regulation der Transkriptstabilität von Genen deren Transkription beeinflusst. Die zum Zeitpunkt der Aktivierung der Gene beobachtete Stabilisierung der Transkripte lässt ebenso ein Rückkopplungsmechanismus zur Regulation der plastidären mRNA-Mengen vermuten (seneszenten Tabak in der 180. Minute: Abbildung 3.3; junge Tabak- und Arabidopsis-Pflanzen in der 120. Minute: Abbildung 3.6A und Abbildung 3.12A). Demnach könnte Cytokinin Transkription und Transkriptstabilität unabhängig voneinander, aber auch indirekt über Rückkopplungsmechanismen regulieren. Im Fall der cytokinindefizienten *Nta:AtCKX2*-Tabakmutante könnte aufgrund der erhöhten Hormonsensitivität und damit schnellerem Antwortverhalten die für die Aktivierung der Transkription notwendige, kurzzeitige Abnahme der plastidären Transkriptmengen in einem engeren Zeitfenster von 15 und 30 min liegen. Die Klärung der Frage, welche Faktoren an der Schnittstelle zwischen Transkription und RNA-Prozessierung/Degradation durch Cytokinin beeinflusst werden, steht jedoch noch aus. Mögliche Kandidaten wären PPR-Proteine (Pentatricopeptide). Die Mehrzahl der charakterisierten PPR-Proteine beeinflussen über posttranskriptionelle Modifikationen (5'-, 3'-Reifung, *cis*-, *trans*-Spleißen, RNA-Editierung) die RNA-Stabilität in Mitochondrien und Chloroplasten (Überblick in Delannoy et al., 2007).

Die quantitativen mRNA-Analysen der *RpoT*-Gene und eines seiner Zielgene, *rpoB*, lassen trotz der beobachteten Cytokinineffekte auf die Transkription nur bedingt eine Korrelation zwischen der Expression der Komponenten des plastidären Transkriptionsapparates (*RpoTp*, *RpoTmp* und *rpoB* als eine von vier Untereinheiten der PEP; Kapitel 1.5) und des Cytokinineffekts auf die Chloroplastentranskription vermuten. So waren die Transkriptmengen von *RpoTp* und *RpoTmp* in der cytokinindefizienten *Nta:AtCKX2*-Tabakmutante in der 30. Minute der BA-Behandlung, zum Zeitpunkt der Aktivierung der Transkription, auf 30% der in den Kontrollen reduziert (Abbildung 3.10D). Möglicherweise

resultierte der starke mRNA-Abbau aber auch aus einem erhöhten Bedarf an den RpoT-Enzymen. Aufgrund der unveränderten Transkriptstabilität von *rpoB* scheint jedoch die mRNA-Menge von PEP nicht für die Aktivierung der Plastidengene verantwortlich gewesen zu sein. Des Weiteren zeigten *RpoTp*, *RpoTmp* und *rpoB* im Arabidopsis-Wildtyp und in der *Ath:CKX2*-Arabidopsis-Mutante 15 min nach BA-Applikation das gleiche Transkriptmuster (Abbildung 3.12C). Der reduzierte Cytokiningehalt hatte demnach keinen Einfluss auf die nukleäre Genantwort auf exogenes Cytokinin. Dagegen lässt im Fall der seneszenten (Abbildung 3.4) sowie sieben-Tage-alten Tabakpflanzen (Abbildung 3.6B) der leichte bzw. 2 bis 5fache Anstieg der *RpoTp*- und *RpoTmp*-Transkriptmengen nach 3 h bzw. 2 h BA-Zufuhr einen direkten Effekt der Transkriptmengen der beiden *RpoT*-Gene auf die Transkription der plastidären Gene zu diesem Zeitpunkt vermuten. Folglich scheint die Induktion der plastidären Transkription durch BA im Tabak über die Regulation der Transkriptstabilitäten der RpoT-Gene, in Arabidopsis sowie in den cytokinindefizienten Mutanten *Nta:AtCKX2* und *Ath:CKX2* hingegen über die Regulation der NEP- und PEP-Enzymaktivitäten kontrolliert zu werden. Überraschenderweise war die *RpoTm*-Transkriptmenge in allen hier untersuchten Pflanzen zeitweise durch BA über das Doppelte erhöht. Das deutet auf eine Kommunikation zwischen Mitochondrien und Zellkern hin, wie er auch zwischen Zellkern und Chloroplasten über retrograde (Zellkern-zu-Chloroplast) und anterograde Signaltransduktionswege (Chloroplast-zu-Zellkern) zu beobachten ist (Überblick in Fernández und Strand, 2008). Darüber hinaus gibt es Hinweise für intraorganelläre Interaktionen (Okada und Brennicke, 2006). Demnach könnten über Signaltransduktionswege vermittelte Änderungen der plastidären Genexpression die mitochondriale Genexpression beeinflusst haben. Dabei ist vielleicht *RpoTmp* als mitochondriale sowie plastidäre Transkriptase eine wichtige Regulationsstelle für die Interaktion zwischen Chloroplasten und Mitochondrien. Es bleibt zu untersuchen, ob es einen direkten Einfluss der Transkriptstabilität von *RpoTmp* und *RpoTm* bzw. ihrer Proteine auf die mitochondriale Transkription gibt.

Die schnelle Antwort auf Cytokinin in den jungen Arabidopsis- und Tabakpflanzen (Abbildung 3.6A und Abbildung 3.12A) korrespondiert mit den von Brenner et al. (2005) durchgeführten Microarrayanalysen von Arabidopsis und deutet auf einen schnellen Transfer des Cytokininsignals in die Chloroplasten oder eine direkte Rezeption des Cytokininsignals durch die Chloroplasten hin. Durch Letzteres würden die Plastiden zumindest semi-autonom bezüglich Cytokininantworten/-aktionen sein. Gestützt wird diese Hypothese von der Existenz eines spezifischen Spektrums an Cytokininmetaboliten in Plastiden (Benková et al., 1999). Mittels GFP-Fusionsexperimenten konnten zudem vier kernkodierte, Cytokinin-synthetisierende IPT-Proteine in den Plastiden von Arabidopsis lokalisiert werden (Kasahara

et al., 2004). Darüber hinaus weisen Studien mit transgenen, IPT-überexprimierenden Pflanzen auf einen eigenen Cytokininsyntheseweg in Plastiden hin (Åstot et al., 2000; Sakakibara, 2006; Sakakibara et al., 2005). Die molekularen Details der Cytokininaktionen in den Plastiden sind jedoch bisher noch nicht aufgeklärt worden.

Während im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp-Arabidopsis-Pflanzen die Transkriptmengen von *psbA*, *rbcL* und *rrn16* 15 min nach BA-Behandlung leicht erhöht waren, blieben sie in der sieben-Tage-alten *Ath:CKX2*-Arabidopsis-Mutante unbeeinflusst durch BA (Abbildung 3.12A). Im Gegensatz zur *Nta:AtCKX2*-Mutante lässt der im Vergleich zum Wildtyp negative Cytokinineffekt auf die Transkriptakkumulation eingeschränkte Signaltransduktionswege in *Ath:CKX2* vermuten. Microarrayanalysen zufolge wiesen sieben-Tage-alte, transgene *35S:CKX1*-Arabidopsis-Pflanzen tatsächlich eine Runterregulierung der Aktivität des CRE1/AHK4-Cytokininrezeptorgens und damit übereinstimmend eine eher gedämpfte Regulation der Transkriptakkumulation von Kern- und Plastidengen durch BA auf (Brenner et al., 2005). Die im Vergleich zum Wildtyp detektierte geringere, aber dennoch nach BA-Behandlung 6fach erhöhte Transkriptmenge von *ARR4* (Abbildung 3.12B) deutet jedoch zumindest auf eine korrekte Rezeption des Cytokininsignals und Funktion des regulatorischen Netzwerks innerhalb der Zellen der cytokinindefizienten Pflanzen hin. Der *response regulator* aus Arabidopsis 4 (*ARR4*) ist als Repressor der Transkription in die Cytokininsignaltransduktion involviert (Osakabe et al., 2002) und dient als Reporter über den Cytokininstatus in Pflanzenzellen (Brenner et al., 2005). Vielleicht werden je nach Stärke der Aktivierung von *ARR4*, bedingt durch endogenen Cytokiningehalt bzw. Entwicklungsstadium der Pflanze, unterschiedliche Faktoren der Signaltransduktion und des Cytokininmetabolismus induziert, wodurch wiederum die Hormonsensitivität und damit die Genexpression beeinflusst wird. Im Fall der *Nta:AtCKX2*-Mutante könnten auch im Vergleich zur sieben-Tage-alten *Ath:CKX2*-Mutante verringerte CK-CRE1/AHK4-Konzentrationen einen cytokininunabhängigen Signaltransduktionsweg und damit eine erhöhte plastidäre Transkriptstabilität in diesem Entwicklungsstadium induziert haben. Das Gen *CYTOKININ INDEPENDENT 2* (*CKI2*), das für eine Histidin-Kinase mit fehlenden Domänen für die Ligandbindung und Membrandurchspannung kodiert, bewirkt bei Überexpression cytokininunabhängiges Wachstum von Kallusgeweben (Kakimoto, 1996). Brenner et al. (2005) detektierten eine Hochregulierung der mRNA-Menge von *CKI2* nach BA-Behandlung und spekulierten, dass *CKI2* eine spezifische Funktion im Erkennen von Änderungen von Ligand-Rezeptor-Konzentrationen (CK-CRE1/AHK4) besitzt und auf diese Weise cytokininunabhängige Signaltransduktionswege und die (schnelle) Aktivierung einer Gruppe von Kern- und Plastidengen in cytokinindefizienten Pflanzen vermittelt. Interessanterweise

ist die Verringerung an Gesamt-iP-Typ Cytokininmengen deutlich stärker in *AtCKX2*-überexprimierenden Pflanzen als in *35S:AtCKX1*-Mutanten, welche aber einen stärkeren Sprossphänotyp zeigten (Abbildung 1.2). Die Konzentrationsänderungen von Z und ZR waren in beiden Fällen gleich. In diesem Zusammenhang spielen möglicherweise verschiedene Cytokininmetabolite in der *Nta:AtCKX2*- bzw. sieben-Tage-alten *Ath:CKX2*-Mutante unterschiedliche Rollen in den vielfältigen Entwicklungsprozessen der Pflanze und bzgl. der Antwort auf äußere (Hormon-)Stimuli.

4.1.3 Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten unbehandelter Pflanzen und differentielle Regulation durch BA

Um den tatsächlichen Einfluss der Cytokininbehandlung auf die Transkription in den Chloroplasten bestimmen zu können, wurde die Transkriptionsaktivität der Plastidengene in den unbehandelten Blättern analysiert. Dafür wurden Tabakblätter von 12-Wochen-alten Tabakpflanzen für 24 Stunden und für die Zeitreihenanalysen weitere 15, 30, 60, 120 und 180 min in Wasser und unter konstantem Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert. Start der Prä-Inkubation und der Zeitreihenanalyse war jeweils fünf Stunden nach Beginn der Lichtperiode. Für die Mehrheit der untersuchten plastidären Gene war in den ersten zwei Stunden nach der Prä-Inkubation eine kontinuierliche Steigerung der Transkription zu beobachten (Abbildung 3.1). Vor dem Hintergrund deutlich sichtbarer Seneszenzerscheinungen mit beginnender Chlorose in den 12-Wochen-alten Tabakblättern wurde eher erwartet, dass Prä-Inkubation und Starklicht die Transkriptionsrate der Plastidengene kontinuierlich verringern würden. Ziel war es auch, dadurch den stärkst-möglichen Effekt von Cytokinin auf die Transkription in den Chloroplasten erzielen zu können. So war im Fall der Gerste die 24 h-Illumination in Wasser als Voraussetzung für die Effekte auf die Plastidentranskription während der nachfolgenden Behandlung mit Cytokinin beschrieben worden (Zubo et al., 2008). Wie ist die kurzzeitige Zunahme der plastidären Transkription in der hier analysierten Zeitreihe zu erklären und wie sind dahingehend die Cytokinineffekte zu interpretieren? Die abgeschnittenen Tabakblätter in der vorliegenden Studie waren insgesamt 27 h konstant hoher Lichtintensität ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ausgesetzt. Als Anpassung an diesen Dauerlichtstress kam es vielleicht über Photorezeptoren vermittelte Redox-Signaltransduktionswege zu einem kurzzeitigen Anstieg der plastidären Transkriptionsaktivität (Li et al., 2008). (Stark-)Licht-induzierte Kinasen könnten an dieser Aktivierung der Transkription beteiligt gewesen sein. So beeinflusst eine Redox-regulierte Thylakoid-assoziierte Kinase STN7 im Zusammenspiel mit STN8 indirekt über einen oder mehrere unbekannte Transkriptionsfaktoren (*redox responsive factors*, RRFs) die Expression von Kern- und Plastidengen in Arabidopsis (Dietzel et al., 2008).

Möglicherweise spielte in diesem Zusammenhang auch die in Arabidopsis-Chloroplasten lokalisierte Sensor-Histidin-Kinase (CSK) eine Rolle. Sie verbindet innerhalb eines Zwei-Komponenten-Redox-Regulationssystems Photosynthese und plastidäre Genexpression miteinander (Puthiyaveetil et al., 2008). Darüber hinaus gibt es Daten für Kinasen nachgeschaltete Regulationsstellen für Licht, die die hier beobachtete plastidäre Genexpression beeinflusst haben könnten. So zeigten organelläre *run-on*-Transkriptionsassays eine Steigerung der plastidären Transkriptionsaktivität durch Starklicht, die einen Hinweis auf spezifische Transkriptionsfaktoren gab. In Gerste-Chloroplasten erfolgte die Aktivierung des Licht-responsiven *psbD*-Promotors (*psbD*-LRP) durch Illumination mit Stark-Blaulicht und UV-A-Licht (Gamble und Mullet, 1989; Christopher und Mullet, 1994). Die Lichtstress-vermittelte Aktivierung der *psbD*-LRP-Transkription dient womöglich der Aufrechterhaltung der D2-Proteinmengen, welche durch Starklicht reduziert wurden (Christopher und Mullet, 1994). Eine plastidäre Transkriptionskinase vom Ser-/Thr-Typ (PTK) vermittelt dabei über den Phosphorylierungszustand der plastomkodierten plastidären RNA-Polymerase (PEP) sehr wahrscheinlich die Kontrolle der Transkription von sowohl Photosynthese- als auch nicht-photosynthetischen Genen (Baena-Gonzalez et al., 2001). Interessanterweise konnten bereits Hewett und Wareing (1973) zeigen, dass eine erhöhte Lichtintensität die endogenen Cytokininkonzentrationen in Pappelblättern ansteigen ließ. Im Einklang damit konnten auch Nordström et al. (2004) in abgeschnittenen Arabidopsis-Blättern die Produktion von Cytokininen beobachten. Möglicherweise kam es in den hier unter Starklicht inkubierten Tabakblättern zur einer Cytokininsynthese und/oder einer Freisetzung aktive Cytokinine aus gebundener Form, die wiederum die Induktion der plastidären Transkription zur Folge hatte. Auch Zubo et al. (2008) zeigten einen Anstieg des Cytokiningehalts während der 24 h-Prä-Inkubation der Gerstenblätter im Starklicht ($270 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), was sie auf eine Cytokininsynthese unter diesen experimentellen Bedingungen schließen ließ. Deren Einfluss auf die Chloroplastentranskription wurde jedoch nicht analysiert, so dass keine Aussage über einen möglichen kurzzeitigen Anstieg der plastidären Transkriptionsaktivität in diesem Zeitraum getroffen werden konnte (persönliche Mitteilung von Yan Zubo).

Unter Starklichtbedingungen überschreitet absorbiertes Licht die photosynthetischen Kapazitäten. Dies führt u.a. zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in den Chloroplasten, die oxidativen Schäden an Proteinen, Lipiden und photosynthetischen Pigmenten verursachen (Niyogi, 1999; Barber und Andersson, 1992). Als Folge kommt es zu einem beschleunigten Umsatz von photosynthetischen Proteinen. Es häufen sich die Hinweise, dass Cytokinin als Antwort auf Lichtstress Gene mit photoprotektiver Funktion induziert (Hutin et al., 2003; Gould, 2004; Vandenbussche et al.,

2007). Übertragen auf die in Starklicht inkubierten Tabakblätter, aktivierten vielleicht diese Gene über oben genannte Signaltransduktionswege, zumindest kurzzeitig, die Transkription von Chloroplastengen. Alternativ könnte die Chloroplastentranskription durch die circadiane Uhr reguliert sein. Es ist bekannt, dass Chloroplastengene, wie die Kerngene (Hare und Van Staden, 1997a), eine circadiane Expression aufweisen, die unter konstanten Bedingungen fortsetzt (Matsuo et al., 2006; Nakahira et al., 1998). Dies könnte auch für die hier untersuchten plastidären Genen gelten, die im 16h-/8h-Hell/Dunkelrhythmus angezogen wurden. Trotz konstanten Starklichts wurde die maximale Transkriptionsaktivität für die Mehrheit der plastidären Gene in der Mitte der Lichtperiode beobachtet (12 Uhr bzw. nach +2 h Inkubation der Tabakblätter im Starklicht und Wasser; Abbildung 3.1). Möglicherweise war das Zusammenspiel von Licht und endogenem Cytokiningehalt für den beobachteten Anstieg der plastidären Transkription in den ersten zwei Stunden Inkubation verantwortlich. Zahlreiche Studien konnten die Regulation der endogenen Cytokininmengen durch eine circadiane Uhr in verschiedenen Pflanzenarten nachweisen (Nováková et al., 2005; Kurapov et al., 2000; Salomé et al., 2006; Stiebeling und Neumann, 1986; Paasch et al., 1997; Wang et al., 2004; Zheng et al., 2006; Hewett und Wareing, 1973). Die maximale Cytokininmenge kurz nach der Mitte der Lichtperiode korreliert zeitlich mit den hohen Aktivitäten von Phytochromen und Cryptochromen (Toth et al., 2001). Womöglich dienen die zeitlich koordinierten Zyklen zur gemeinsamen Optimierung der regulatorischen Funktionen von Cytokinin und Photorezeptoren. Bisher wurde jedoch nicht untersucht, ob sich die tagesrhythmischen Schwankungen der Cytokininmengen unter konstanten Dunkelbedingungen fortsetzen. Alternativ könnte über die circadiane Regulation der Aktivität der Photorezeptoren und der Licht-Signaltransduktion die Cytokininmengen beeinflusst sein (Rashotte et al., 2006; Hwang und Sheen, 2001; Sweere et al., 2001; Salomé et al., 2006; Wang et al., 2004). Die physiologische Bedeutung der tageszeitlichen Cytokininspitzen könnte u.a. eben in der Regulation der Genexpression liegen. In der Annahme, dass sich die tageszeitlichen Transkriptrhythmen unter konstantem Starklicht fortgesetzt haben, kam es nach 180 min möglicherweise circadian-bedingt mehrheitlich zu einer Abnahme der Transkription in den Chloroplasten.

Das gleiche Oszillationsmuster der Chloroplastentranskription konnte auch für junge Tabakpflanzen (siehe Anhang: A 2) sowie für die cytokinindefiziente *Nta:AtCKX2*-Tabakmutante beobachtet werden (Abbildung 3.9). Im Gegensatz zum Wildtyp wurde für die *Nta:AtCKX2*-Mutante auch die Transkriptionsaktivität kurz nach dem Abschneiden der Blätter (0 h) bestimmt. Zum 0 h-Zeitpunkt waren die Transkriptionsaktivitäten höher als kurz vor der BA-Behandlung (Abbildung 3.9). Demnach bewirkte der 24 h-Dauerlichtstress offenbar eine

Abnahme der basalen Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten, wobei deren Tagesrhythmik in der Transkription offensichtlich auch unter konstantem Licht erhalten blieb. In diesem Zusammenhang ist die homöostatische Regulation der tagesrhythmischen Expression von Kern- und Plastidengen durch Phytohormone in zahlreichen Studien nachgewiesen worden (Hewett und Wareing, 1973; Robertson et al., 2008; Hare und Van Staden, 1997b; Matsuo et al., 2006; Salomé et al., 2006). Aber erst quantitative 24 h-Zeitreihenanalysen unter konstantem Starklicht würden über eine mögliche circadiane Transkriptionsrhythmik der Plastidengene unter Einfluss des endogenen Cytokiningehalts Aufschluss geben.

Im jungen Tabak und in Arabidopsis führte die zweistündige BA-Behandlung für die Mehrheit der Plastidengene zu einer Steigerung der Transkription (siehe Anhang A 3 und A 4). Die deutlich verringerte Transkriptionsaktivität in den unbehandelten 12-Wochen-alten Tabak-Wildtyp- und *Nta:AtCKX2*-Blättern zum Zeitpunkt der Aktivierung der Transkription durch BA (3 h bzw. 30 min) führte jedoch zu der Frage, ob auch in diesem Entwicklungsstadium die Cytokininapplikation die Chloroplastentranskription induziert oder es lediglich Stress-induzierten Abnahmen oder/und tagesrhythmischen Schwankungen der Transkription entgegenwirkt. Cytokinin steigerte die Transkription einiger Chloroplastengene im Wildtyp-Tabak über die anfänglich gemessene Menge vor der BA-Behandlung (siehe Anhang: A 1; *atpB*, *atpH*, *atpF*, *ndhB*, *psbA*, *rps4* und *petD*), im Fall von *psaA*, *psbB*, *accD*, *rbcL*, *atpH*, *ndhB*, *petB* und *rpoB* der *Nta:AtCKX2*-Mutante sogar vor der Prä-Inkubation (Abbildung 3.9). Für einzelne Gene wie *psaC*, *accD*, *petB* (Wildtyp-Tabak) und *psbE* (*Nta:AtCKX2*) konnten trotz BA-Behandlung die Anfangswerte nicht erreicht werden. Die differentielle Aktivierung der Transkription korrespondiert mit Transkriptionsanalysen der Gerste, bei der positive und differentielle Cytokinineffekte auf die Transkription von Chloroplastengen in Abhängigkeit vom Licht und dem Alter der Zellen und Blätter beobachtet werden konnte (Zubo et al., 2008). Aber im Unterschied zur Gerste waren in Arabidopsis und Tabak Gene für Komponenten der Genexpressionsmaschinerie (z.B. *rps4*, *rpoB*), für den Elektronentransport (z.B. *petB*, *petD*, *ndhB*) sowie für den Photosyntheseapparat (z.B. *psaA*, *psbB*) durch Cytokinin aktiviert. Darüber hinaus antworteten einzelne Gene entwicklungs- und pflanzenspezifisch auf Cytokinin. So war in der Gerste *rrn16* eines der am stärksten Cytokinin-responsiven Gene (Zubo et al., 2008). Wohingegen BA sowohl im jungen als auch im seneszenten Tabak keinen Einfluss auf die Transkriptsynthese von *rrn16* hatte. Auf Transkriptebene war der Cytokinineffekt teilweise zu beobachten (Abbildung 3.3 Abbildung 3.6A). Interessanterweise konnte eine Cytokinin-vermittelte Induktion der *rrn16*-Transkription in Arabidopsis und der *Nta:AtCKX2*-Tabakmutante verzeichnet werden

(Abbildung 3.8 und Abbildung 3.11). Im Gegensatz zu *Arabidopsis* spiegelte sie sich jedoch in der cytokinindefizienten Mutante nicht auf Transkriptebene wider (Abbildung 3.10C und Abbildung 3.12A). Darüber hinaus blieb die *rrn16* mRNA-Menge in Tabak auch von der konstitutiven *35S::AtCKX2*-Überexpression und damit von der verringerten endogenen Cytokininmenge unbeeinflusst (Abbildung 3.10C). Weitere Beispiele für eine differentielle Aktivierung der Plastidengene sind *atpH*, *atpF*, *accD*, *rps4* und *petB* durch BA. Zusammengefasst, konnte in dieser Arbeit, wie in Zubo et al. (2008), ein differentieller Effekt von Cytokinin auf die Transkription und Transkriptakkumulation von Chloroplastengen in *Arabidopsis* und Tabak in Abhängigkeit von der Pflanzenspezies, vom endogenen Cytokiningehalt sowie vom Alter der Zellen und seiner Chloroplasten demonstriert werden.

4.1.4 Modell: Cytokinineinfluss auf die plastidäre Genexpression in *Arabidopsis* und Tabak

Abbildung 4.1 zeigt ein Modell für den Cytokinineinfluss auf die plastidäre Genexpression in *Arabidopsis* und Tabak in Abhängigkeit vom physiologischen Status der Chloroplasten. Demnach werden Licht und exogenes BA über Photo- bzw. Cytokininrezeptoren perzipiert. Die schnelle Aktivierung plastidärer Gene zusammen mit der Teillokalisierung der Cytokininsynthese und dem –metabolismus geben außerdem Hinweise auf eine direkte Rezeption von BA durch die Plastiden (Synková et al., 2006; Brenner et al., 2005; Benková et al., 1999; Polanská et al., 2007; Sakakibara et al., 2005). Die Kinaseaktivität der Rezeptoren wird u.a. vom Redox-Status der Zellen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bestimmt (Dietzel et al., 2008; Foyer et al., 2009). Dabei beeinflusst der physiologische Zustand der Chloroplasten entscheidend die Sensitivität gegenüber exogenes BA. Ein Schwellenwert für die Sensitivität, der für die Cytokininantwort benötigt wird, ist der bestimmende Faktor der Cytokininaktion (Bradford und Trewavas, 1994). Die Antwortkapazität der Chloroplasten auf exogenes BA ist u.a. Produkt der Regulation des Cytokininmetabolismus (inaktive N-Glukoside, re-mobilisierte O-Glukoside), des CK-Transports zwischen Organen und relativen Konzentrationen und Interaktionen zu anderen Hormonen (z.B. ABA/CK-Ratio). Der interne Cytokiningehalt und damit der physiologische Zustand der Chloroplasten wird außerdem spezies-spezifisch vom Alter (Entwicklungsstadium) der Pflanze und seiner Zellen bestimmt. Dies führt zu den beobachteten gattungs- und sogar artspezifischen Unterschieden in der Antwort auf exogenes Cytokinin (Hare und Van Staden, 1997a).

Im jungen Entwicklungsstadium finden verstärkt Zellteilungen in meristematischen Geweben statt, wo auch eine hohe Aktivität von Cytokinin anzutreffen ist (D'Agostino et

al., 2000; Romanov et al., 2002). Möglicherweise ist die Cytokininantwortkapazität nicht gesättigt und es kommt dadurch zu schnelleren Cytokininantworten als in seneszenten Pflanzen. Dagegen führen Seneszenzprozesse in alten Pflanzen zu veränderter Plastidenmorphologie mit Änderungen im Cytokiningehalt, die maßgeblich die Sensitivität beeinflusst. Folglich antwortet die Zelle in diesem Entwicklungsstadium langsamer auf exogenes BA. Im Gegensatz zum Wildtyp weisen die 12-Wochen-alten Blätter der *Nta:AtCKX2*-Mutante mit konstitutiv reduzierten Cytokiningehalt als Kompensation für die Cytokinindefizienz ein sensitiveres Signaltransduktionssystem auf. Aus diesem Grund antworteten die plastidären Gene bereits innerhalb der ersten halben Stunde der BA-Behandlung. Die Regulation der plastidären Genexpression könnte über in Chloroplasten Cytokinin-regulierte Kinasen (STN7, Thylakoid-assoziierte Ser/Thr-Proteinkinase; CSK, Chloroplasten-Sensor-Kinase), Transkriptionskinasen (*psbD*-LRP-Transkription), spezifischen, plastidären Transkriptionsfaktoren (z.B. PEND) sowie Cytokinin-bindenden Proteinen (ZBP_Ch1, Kulaeva et al., 2000; Lyukevich et al., 2002a) vermittelt werden. Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivierung der Plastidengene scheinen außerdem verringerte Transkriptmengen zu sein. Möglicherweise wird die Transkriptinstabilität über (vielleicht Cytokinin-responsive) PPR-Proteine reguliert. Darüber hinaus hat die BA-Applikation einen stärkeren Einfluss auf plastidäre Transkriptsynthese als auf die Transkriptakkumulation. Offenbar gewährleistet die zelluläre Homöostase trotz Stress (Starklicht, BA-Behandlung) eine normale Genexpression und Funktion der Chloroplasten. Eine direkte Korrelation zwischen der Expression der kernkodierte, plastidären RNA-Polymerasen (RpoTp, RpoTmp) und der plastidären Genexpression konnte in dieser Arbeit nicht eindeutig festgestellt werden. Es gibt jedoch Hinweise für eine Regulation von RpoTp und RpoTmp auf Transkriptebeine (Tabak) sowie Proteinebene durch BA (Arabidopsis, *At:CKX2*, *Nta:AtCKX2*).

Die plastidäre Genexpression und damit der physiologische Zustand der Chloroplasten hat Einfluss auf Zellkern und Mitochondrien. Licht und BA wirken auch direkt im Zellkern und womöglich auch in den Mitochondrien. Das Expressionsmuster der Kern- und mitochondrialen Gene wiederum beeinflusst die Cytokinin-signaltransduktion bzw. die interorganellären Interaktionen. Die jeweiligen Signalmoleküle sind hierbei noch nicht bekannt (zweiseitige, gestrichelte Pfeile).

Zusammengefasst aktiviert BA in Abhängigkeit von der Pflanzenart und des physiologischen Zustands ihrer Chloroplasten innerhalb eines bestimmten Antwortzeitfensters differentiell die Transkription von Plastidengenen. In weiteren Experimenten sollten mögliche plastidäre

Cytokininrezeptoren, Komponenten der Signaltransduktionswege, der RNA-Prozessierung sowie *cis*- und *trans*-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die in die Cytokinin-vermittelte plastidäre Genexpression involviert sind. Es bleibt zu klären, ob Cytokinin direkt mit solchen Faktoren innerhalb der Chloroplasten und/oder indirekt über die Regulation von bekannten und unbekannten nukleären und cytosolischen Faktoren interagiert.

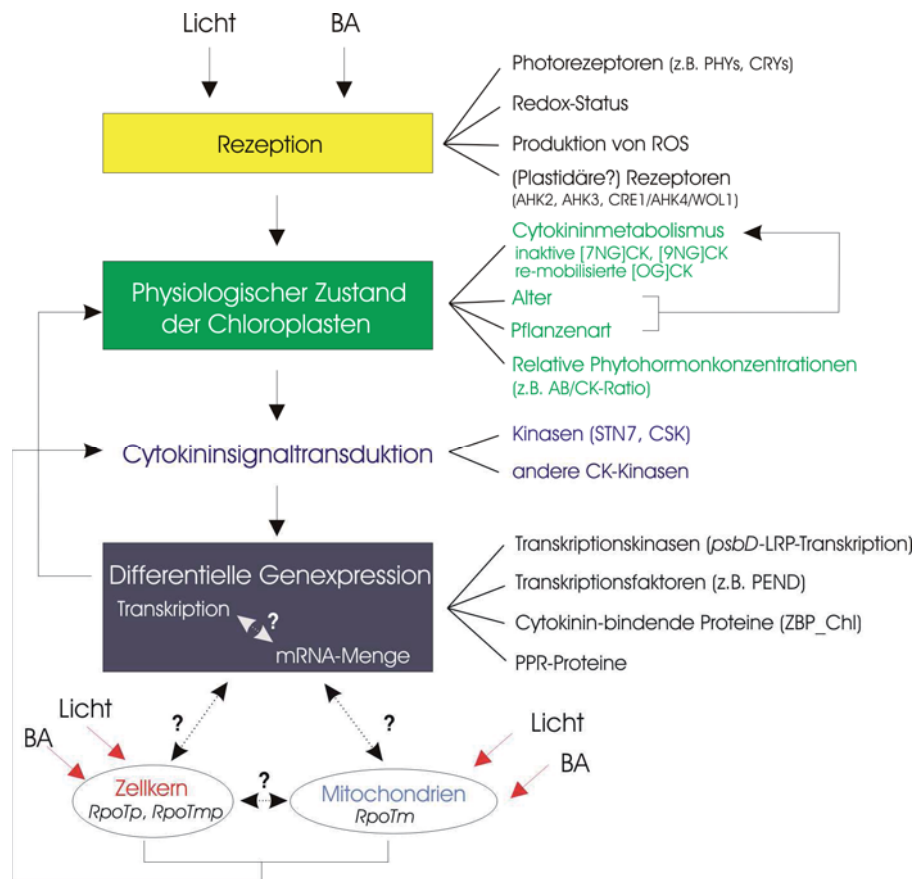


Abbildung 4.1: Einfluss von Cytokinin auf die plastidäre Transkription. Der Cytokinineneinfluss auf die plastidäre Genexpression hängt vom physiologischen Zustand der Chloroplasten ab. Abkürzungen: PHYs, Phytochrome; CRYs, Cryptochrome; ROS, *reactive oxygen species*; CK, Cytokinin; NG, N-Glukosid; OG, O-Glukosid; CSK, Chloroplasten-Sensor-Kinase; STN7, Serin/Threonin-Proteinkinase 7; ZBP_ChI, Zeatin-bindendes Protein in den Chloroplasten; PPR, Pentatricopeptid; BA, 6-Benzyladenin. Details im Text.

4.2 Analyse der *rpoB*-Transkription in Tabak

Plastidengene höherer Pflanzen werden von mindestens zwei RNA-Polymerasen transkribiert: die plastomkodierte plastidäre RNA-Polymerase vom Bakterientyp (PEP) und die kernkodierte plastidäre Phagentyp-RNA-Polymerase (NEP). Letztere wird in Arabidopsis und Tabak von zwei Phagentyp-Enzymen (RpoTp und RpoTmp) repräsentiert. Plastidär kodierte RNA-Polymerasen nutzen Promotoren vom Bakterientyp mit den typischen -10/-35-Boxen,

die vom Sigmafaktor des PEP-Holoenzym erkannt werden. NEP hingegen hat einen komplett anderen Bedarf an *cis*-Elementen. Mit Promotorstudien in PEP-defizientem Pflanzenmaterial gelang die Identifizierung eines für die Initiation der Transkription notwendigen CRT-Motivs. Dieses Motiv ist im YRTA-Sequenzmotiv mitochondrialer Promotoren höherer Pflanzen enthalten, was auf eine Konservierung der Transkriptionsmaschinerie in beiden Organellen hinweist (Weihe und Börner, 1999). Die katalytischen Hauptuntereinheiten der PEP werden von den plastidären Genen *rpoA*, *rpoB*, *rpoC2* und *rpoC2* kodiert. Es wird angenommen, dass NEP die *rpo*-Gene in den frühen Stadien der Chloroplastenentwicklung transkribiert, um so die gesamte Plastidentranskription anzutreiben (Baumgartner et al., 1993; Hajdukiewicz et al., 1997). Damit würde NEP die Expression der plastidär kodierten RNA-Polymerase regulieren. Aus diesem Grund könnte der *rpoB*-Promotor eine zentrale Regulationsstelle für die Expression der Photosynthesegene darstellen.

Der Promotor des *rpoB/C1/C2*-Clusters (*rpoB*-Operon) von Tabak wurde *in vitro* analysiert und scheint ein typischer Typ Ia NEP-Promotor an der Position -345 relativ zum Startkodon zu sein. Das T des CRT-Motivs ist stark konserviert. Allerdings gab es keine Anhaltspunkte für weitere regulatorische *cis*-Elemente (Liere und Maliga, 1999a). Die Nachteile von *in vitro*-Systemen sind jedoch niedrige und labile Enzymaktivitäten sowie der Verlust von potentiellen regulatorischen Faktoren bei der Aufarbeitung der Extrakte. *In vitro*-Systeme können demnach nur begrenzt zur Aufklärung von Mechanismen der plastidären Expression beitragen (Liere und Maliga, 1999a). Darüber hinaus lassen diverse Studien Spezifitätsfaktoren vermuten, die für eine gezielte Erkennung organellärer Promotoren durch eukaryotische RpoT-Polymerasen benötigt werden (Liere und Börner, 2007b; Kühn et al., 2007; Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008; Bohne et al., 2007; Cotney und Shadel, 2006; Bligny et al., 2000).

Das Ziel dieser Arbeit war eine *in vivo*-Charakterisierung des *rpoB*-Promotors *PrpoB*-345 aus *Nicotiana tabacum*. Für die Identifizierung putativer regulatorischer *cis*-Elemente wurden verschiedene transplastome *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten hergestellt und bezüglich ihrer Promotoraktivität analysiert. Zudem wurde der Einfluss einer Punktmutation im *core*-CAT-Motiv des *rpoB*-Promotors auf die Transkription des *rpoB*-Operons selbst sowie weiterer, ausgewählter plastidärer und nukleärer Gene untersucht.

4.2.1 Existieren regulatorische Sequenzelemente stromaufwärts und/oder stromabwärts von *PrpoB*-345?

Interessanterweise sind mögliche positive und negative Regulatoren der *rpoB*-Transkription an den Positionen -1174 bis -1168 bzw. -1221 bis -1229 relativ zum Startkodon beschrieben worden (Inada et al., 1997). In den *rpoB*-core-Promotormutantenlinien sind diese putativen Elemente vom *rpoB*-Operon durch zusätzliche 1,4 Kilobasen der *aadA*-Kassette getrennt. Die Verlagerung dieser Sequenzelemente beeinträchtigt jedoch offenbar nicht die *rpoB*-Transkription (Abbildung 3.22). Auch die dem Sequenzbereich von -386 bis -396 relativ zum Startkodon (-42 bis -52 relativ zum Transkriptionsstartpunkt) zugeschriebene Funktion der Transkriptionsinitiation konnte durch Deletionen im Bereich von -28 bis -277 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle nicht bestätigt werden (Abbildung 3.14). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass der Sequenzbereich von -20 bis +5 relativ zur Transkriptionsstartstelle noch 100% Transkriptionsaktivität aufwies (Liere und Maliga, 1999a). Damit wäre der Promotorbereich von *rpoB* erstaunlich klein. Der Promotor von *accD* ist ein zweites Beispiel für ein Gen mit einer sehr kleinen Promotorregion. *In vitro*-Transkriptionsassays identifizierten für *PaccD*-129 in Tabak ein 19 Basenpaar kurzes Promotorfragment (-17 bis +2, Liere und Maliga, 1999b). Möglicherweise bestätigen sich die *in vitro*-Daten und für die Transkription von *rpoB* *in vivo* bedarf es keiner regulatorischen Faktoren. Alternativ könnten regulatorische Promotorelemente weiter stromaufwärts der *rpoB* 5'-UTR (untranslatierte Region) lokalisiert sein. In der Literatur häufen sich Hinweise über mögliche Co-Faktoren der RpoT-Enzyme. Während die T7 RNA-Polymerase als Einzelpeptid keinen Transkriptionsfaktor braucht (Cheetham und Steitz, 2000), benötigen mitochondriale Phagentyp-RNA-Polymerasen von Tieren und Hefen für die Promotorerkennung und optimale Transkriptionseffizienz zwei Transkriptionsfaktoren (Cotney und Shadel, 2006). Solche allgemeinen Transkriptionsfaktoren sind in den Pflanzen bisher noch nicht bekannt, aber *in vitro*-Transkriptionsassays deuten eine Beteiligung von einem oder mehreren Hilfsfaktoren der RpoTm für das Modulieren der DNA-Struktur oder Öffnen des Doppelstrangs sowie von Promotorkomplexen an. Das eingeschränkte Erkennen von NEP-Promotoren durch RpoTp *in vitro* könnte auch die Abwesenheit von bisher unbekannten Co-Faktoren der RpoTp unter diesen Bedingungen widerspiegeln (Kühn et al., 2007). Das Erkennen des mitochondrialen Promotors von *atpA* (*PatpA*-209) in transgenen Chloroplasten durch RpoTp ließ ebenso auf die Existenz eines oder verschiedener plastidärer Transkriptionsfaktoren schließen. Unterstützt wird diese Annahme, dass *in vitro* RpoTp an diesen Promotor nur fehlerhaft initiiert und RpoTm ihn in *in vitro*-Transkriptionsassays erst

gar nicht erkennt (Bohne et al., 2007). Darüber hinaus lassen vergleichende Transkriptionsstudien von transgenen Arabidopsis-Pflanzen mit veränderter oder fehlender RpoTp-Aktivität promotorspezifische Faktoren vermuten, die in bestimmten Entwicklungsstadien agieren (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2008). Aus diesem Grund sollten für weitere Promotorstudien Konstrukte mit längeren 5'-*rpoB*-Sequenzbereichen hergestellt werden, die z.B. auch die von Inada et al. (1997) detektierten Positionen für putative positive und negative Regulatoren der *rpoB*-Transkription erfassen.

Die transplastomen Tabaklinien mit den unterschiedlich deletierten Bereichen des *rpoB*-Promotors können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Zur Gruppe 1 gehören die Mutanten (NtSH-6 und NtSH-7) mit der endogenen 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) des *rpoB*-Gens, während die Mutanten der Gruppe 2 (NtSH-15 und NtSH-16) anstelle dessen einen kurzen Bereich des 5'-UTR des *rbcL*-Gens mit der für die Translation wichtigen Ribosomenbindestelle besitzen (*LrbcL*[S]). Darüber hinaus werden die *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten der Gruppe 1 und 2 bezüglich ihres Reportergens unterschieden. In NtSH6.2 und NtSH-7.14 ist das *rpoB*-Promotorfragment mit dem Reportergen GUS und in NtSH-15.16 und NtSH-16.28 mit dem Reportergen GFP fusioniert (Abbildung 3.14). Interessanterweise wiesen die NtSH-15.16- und NtSH-16.28-Pflanzen (-277/+6, -28/+6) im Vergleich zu den NtSH-6.2- und NtSH-7.14-Pflanzen (-277/+339, -28/+339) eine wesentlich geringere Transkriptakkumulation des GFP-Gens auf, obwohl sie sich nur in der vom *rpoB*-Promotor stromabwärts gelegenen Region unterscheiden. Anstelle der endogenen 5'-UTR des *rpoB*-Gens (NtSH-6.2, NtSH-7.14) besitzen NtSH-15.16 und NtSH-16.28 die verkürzte 5'-UTR des *rbcL*-Gens. Somit scheinen sich auf der endogenen 5'UTR des *rpoB*-Gens regulatorische Regionen zu befinden, welche sowohl die Transkription als auch die Transkriptstabilität (im Vergleich zur *rbcL* 5'-UTR) positiv regulieren (Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18). Komplex wird die Situation dadurch, dass gerade die Mutante mit dem kürzesten Promotorbereich, im Unterschied zu den anderen Promotor-Deletionsmutanten, auf die zweistündige Cytokininbehandlung mit einer stabilen Transkription von *PrpoB*_(-28/+6)::GFP antworteten (NtSH-16.28; Abbildung 3.19). Wie sind die *in vivo*-Daten zu interpretieren? Eine mögliche Erklärung könnte in der Lokalisation des Transgens im Tabakplastom liegen. Die Insertion (*PrpoB*::GUS/*TrbcL* bzw. *PrpoB*::*LrbcL*(S)/GFP/*TrbcL*) des Transformationsvektors pRB94 wird in die intergenische Region zwischen den tRNA-Genen *trnfM* und *trnG* eingebaut (Abbildung 1.3). Stromaufwärts von *trnfM* befinden sich in der gleichen Leserichtung außerdem *rps4* sowie das *psaA/psaB*-Operon. Die zweistündige Cytokininbehandlung von sieben-Tage-alten Wildtyp-Tabak führte zu einer zweifachen Steigerung der Transkriptionsrate des *psaA/psaB*-Operons (Abbildung 3.5). Möglicherweise

kam es dabei zu einem Durchlesen, so dass andere Gene, wie *rps4*, *trnfM* und eben das Transgen mit transkribiert wurden. In PEP-defizienten Arabidopsis-Mutanten konnte die Akkumulation von langen, fehlerhaft prozessierten Transkripten nachgewiesen werden (Pfalz et al., 2006). Neben der Transkription an *PrpoB*-345 trug vielleicht die Cytokinin-induzierte Transkription von einem Promotor weiter stromaufwärts (z.B. der Promotor von *psaA*) zusätzlich zur Gesamt-*run-on*-Transkriptmenge bei. Aufgrund der längeren Promotor-Reportergen-Konstrukte in NtSH-6.2 (-277/+339), NtSH-7.14 (-28/+339) und NtSH-15.16 (-277/+6) wurden vielleicht insgesamt weniger der entsprechenden *run-on*-Transkripte synthetisiert als in der transgenen Pflanze mit dem kürzesten Konstrukt (NtSH-16.28, -28/+6). Möglicherweise führte die aberrante Transkription auch zu den instabilen Transkripten (Abbildung 3.20). *Northern Blot* Analysen würden über die Akkumulation von verschiedenen langen Transkripten Aufschluss geben. Zu beachten ist, dass im Vergleich zum Wildtyp-*rpoB* (Abbildung 3.5) die Transkription in den transplastomen Pflanzen mit den längeren Promotorbereichen (-277/+339, -28/+339 und -277/+6), aber auch in der Mutante mit dem kürzesten Promotorabschnitt (-28/+6) nicht durch Cytokinin induziert wurde (Abbildung 3.19). Demnach fehlten in den Mutanten wichtige Sequenzelemente außerhalb des Bereichs von -28 bis -277 (relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle) für eine Cytokinin-vermittelte Aktivierung der Transkription, wie sie im Wildtyp-Tabak zu beobachten war. Überraschenderweise waren im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.6) die mRNA-Mengen von *rpoB* in den Promotor-Deletionsmutanten, bis auf NtSH-16.28 (-28/+6), deutlich verringert (Abbildung 3.20). Im Fall der Deletionsmutanten wurden lediglich zusätzlich zum ursprünglichen *rpoB*-Promotor deletierte Bereiche von *PrpoB*-345 eingefügt. Offenbar scheint die Insertion der *rpoB*-Promotorkonstrukte trotzdem Auswirkungen auf die Gesamtexpression in den Chloroplasten zu haben. Es sei hier zu erwähnen, dass in dieser Arbeit pro Konstrukt nur mit einer Mutantenlinie gearbeitet werden konnte. Um verlässliche Aussagen über den Einfluss des Transgens auf die Transkription und Transkriptstabilität bzw. regulatorischer Sequenzelemente in Promotorbereich treffen zu können, sollte mit mehreren unabhängigen Mutantenlinien gearbeitet werden. Aus dem transformierten Ausgangsmaterial waren jedoch nur wenige homoplastome Pflanzen hervorgegangen (Kapitel 3.3.2). Des Weiteren ist es bisher nicht gelungen, transplastome Pflanzen mit längeren Promotor-Reportergen-Konstrukten (z.B. -951/+339, -951/+6) zu gewinnen, was auf homologe Rekombinationsereignisse im Chloroplastengenom schließen lässt. Eines der Nachteile bei der Verwendung von plastidären Promotoren und UTRs ist, dass ihre Integration in transgenen Expressionskassetten eine Duplikation von Sequenzen des Plastoms zur Folge hat, welches unerwünschte homologe Rekombination verursachen kann, die schließlich in partielle

Deletionen oder Inversionen resultieren (Svab und Maliga, 1993; Iamtham und Day, 2000; Rogalski et al., 2006). Darüber hinaus liegen im Fall der Deletionsmutanten der transgene und der Wildtyp-*rpoB*-Promotorbereich mit einem Abstand von ca. 14000 bp relativ nahe beieinander. Möglicherweise konkurrieren putative Transkriptionsfaktoren um Sequenzelemente im ursprünglichen und integrierten Promotor. So bleibt zu überprüfen, ob auch die Transkription *rpoB* in diesen Mutanten tatsächlich von der Insertion der transgenen Kassette beeinflusst ist.

Die vergleichenden Transkriptions- und Transkriptanalysen der Reportergen-Transkriptmengen weisen zumindest auf die Existenz möglicher positiv regulierender Sequenzelemente in der endogenen *rpoB* 5'-UTR von Tabak (+6 bis +339 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle) hin. Unterstützung findet die Annahme in der Detektion eines putativen Promotors in diesem Bereich (Kapitel 4.2.2). Die BA-Behandlung der Deletionsmutanten lässt außerdem Cytokinin-responsive Transkriptionsfaktoren vermuten, die mit Sequenzen stromaufwärts von -277 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle interagieren. Die Unterschiede in der Wahl des Reportergens sowie des *rbcL* leaders erlauben allerdings keinen direkten Vergleich zwischen den transgenen Tabaklinien mit *PrpoB*::GUS- und denen mit *PrpoB*-*LrbcL*(S)::GFP-Konstrukten. Es ist für die weitere Charakterisierung des *rpoB*-Promotors *in vivo* zu empfehlen, mögliche Effekte des GUS- bzw. GFP- Reportergens sowie des *rbcL* leaders auf die Promotoraktivität auszuschließen.

4.2.2 Ein neuer Promotor stromaufwärts des *rpoB*-Operons?

Um die Bedeutung des *in vitro* charakterisierten „CRT“-Promotors des *rpoB*-Operons beurteilen zu können, wurden transplastome Tabaklinien, die CAC statt des Wildtyp-*core*-Promotormotivs CAT besitzen (mC-Mutante, Legen, 2002), untersucht. Überraschenderweise zeigten diese transformierten Pflanzen einen Wildtyp-Phänotyp und nicht den erwarteten weißen Phänotyp einer PEP-defizienten Mutante (Allison et al., 1996; De Santis-Maciossek et al., 1999). Es kam weder zu einer signifikanten Runterregulierung von PEP-Genen noch zu einer verstärkten Transkription von NEP-Genen als mögliche Kompensation für den PEP-Mangel wie er in PEP-defizienten Pflanzen zu beobachtet ist (Allison et al., 1996; Hajdukiewicz et al., 1997; Legen et al., 2002). Im Gegenteil, die Transkriptmengen der NEP-Gene *RpoTp* und *RpoTmp* waren in beiden Mutanten mC und mE sogar nahezu halbiert (Abbildung 3.23A). Proteinanalysen könnten klären, ob die geringen Transkriptmengen von

RpoTp und *RpoTm* auf einen schnellen mRNA-Abbau aufgrund erhöhter RpoT-Proteinmengen zurückzuführen sind.

Ganz offenbar ist PEP in mC noch aktiv. Dafür würde die, trotz Punktmutation im *core*-Promotormotiv, stabile Transkription von *rpoB* (Abbildung 3.22) sprechen. Zwar scheinen plastidäre Transkripte von Genen wie *psbA*, *rbcL* und *rpoB* in der Mutante mC etwas instabiler als im Wildtyp zu sein, aber offensichtlich reichen die mRNA-Mengen für eine normale Entwicklung der Pflanzen aus. Das könnte darauf hindeuten, dass der Wildtyp-Tabak seine Kapazitäten für Transkription und Transkriptakkumulation nicht ausschöpft. Ähnliches wurde für die Photosyntheserate in cytokinindefizienten Pflanzen beobachtet (Werner et al., 2008). Interessant ist hierbei, dass die Transkriptmenge des *RpoTm*-Gens (kodiert für die Phagentyp-RNA-Polymerase in den Mitochondrien), wie die NEP-Gene, ebenso verringert war. Über retrograde Signalübertragungsmechanismen werden der funktionelle und Entwicklungsstatus der Chloroplasten und Mitochondrien dem Zellkern übermittelt, um auf diese Weise dessen Genexpression zu regulieren (Überblick in Pesaresi et al., 2007). Bis auf die gegenseitige Abhängigkeit vom Metabolismus ist über die Kommunikation zwischen Chloroplasten und Mitochondrien und der Koordination beider Aktivitäten jedoch bisher nur wenig bekannt. NO, Ascorbat und reaktive Sauerstoffspezies werden als mögliche Signale zwischen Mitochondrien und Chloroplasten diskutiert (Raghavendra und Padmasree, 2003). Experimentelle Beweise stehen jedoch noch aus. Dennoch zeigte die Analyse von Mutanten mit gestörter organellärer Proteinsynthese, dass Mitochondrien und Chloroplasten gemeinsam über die organelläre Genexpression-vermittelte Signaltransduktion die nukleäre Genexpression modulieren (Pesaresi et al., 2006). Möglicherweise wirken sich im Fall der Punktmutation in *PrpoB*-345 Änderungen in der plastidären Transkription neben der nukleären auch auf die mitochondriale Genexpression aus.

Wie oben erwähnt, ist die Transkription von *rpoB* von der Punktmutation nicht betroffen. Diese Beobachtung gab Anlass zu der Vermutung, dass der *rpoB*-Promotor -345 entweder für die Transkription des *rpoB*-Operons nicht essentiell ist und/oder zusätzliche, kompensatorische Transkriptionsinitiationsstellen existieren. Aus diesem Grund wurde die Region stromaufwärts vom *rpoB*-Promotor (*PrpoB*-345) in Tabak mittels Kartierung der 5'-Enden durch *Primer Extension* und 5'-RACE-Technik analysiert. Letztere Methode erlaubt dabei das Unterscheiden zwischen primären und prozessierten Transkriptenden. Beide Methoden verifizierten das Ausschalten von *PrpoB*-345 durch die Punktmutation im *rpoB*-*core*-Promotormotiv CAT (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Da im Gegensatz zur *Primer Extension* die 5'-RACE-Technik nukleotidgenau das 5'-Ende an der Position -344/3 relativ

zum Startkodon kartierte, wird im Folgenden für diesen Promotor die Bezeichnung „*PrpoB*-344/3“ verwendet. Des Weiteren beziehen sich die nachfolgenden Angaben in Basenpaaren (bp) immer auf den Translationsstartpunkt von *rpoB*. Die gleichen Starternukleotide der TAP-behandelten und unbehandelten RNAs aus Wildtyp und Kontrollmutante mE (Abbildung 3.26) erfordern die Ribonuklease-Protektion von *in vitro-capped* Transkripten für die eindeutige Bestimmung dieser 5'-Enden als Primärtranskripte. Die Kartierung der NEP-Initiationsstelle *PrpoB*-344/3 in den 5'-RACE-Produkten aus TAP-behandelter RNA der PEP-defizienten *ArpoA*-Mutante lassen jedoch vermuten, dass es sich bei jenen RNAs um eine gemischte Population von primären und prozessierten 5'-Transkriptenden zu handeln scheint, die an identischen Nukleotiden initiieren, aber entweder Tri- oder Monophosphate tragen. Demnach würde der *rpoB*-Promotor in den mC-Mutanten nicht mehr funktionell, aber auch nicht essentiell für eine normale Pflanzenentwicklung sein. Woher stammen dann die *rpoB*-Transkripte? Da Pflanzen, welche die Punktmutation im *rpoB*-Promotor aufwiesen, verbunden mit der *aadA*-Kassette (mC) und Pflanzen ohne Mutation, aber mit der *aadA*-Kassette (mE), nahezu identische Transkriptions- und Transkriptmuster aufwiesen (Schema: Abbildung 3.21; Abbildung 3.22 Abbildung 3.23), wurde zuerst vermutet, dass statt der Punktmutation im *rpoB-core*-Promotor vielmehr die Insertion der Kassette *per se* einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität und Transkriptstabilität hatte. Die Existenz von Promotorelementen innerhalb der *aadA*-Kassette gilt jedoch als recht unwahrscheinlich. So waren kartierte 5'-Transkriptenden innerhalb der *aadA*-Kassette entweder unabhängig von der TAP-Behandlung gleich abundant (Abbildung 3.27 und Abbildung 3.29), was eher auf Prozessierungsereignisse schließen lässt, oder konnten in den *rpoB*-Promotor-Deletionsmutanten mit der gleichen Resistenzkassette nicht bestätigt werden (Abbildung 3.24, Primer-702). Im Einklang mit vorigen *Primer Extension*-Analysen (Legen, 2002, Position -294) wurde dagegen im Wildtyp und in den beiden Mutanten mC und mE eine putative Transkriptionsinitiationsstelle -292/-288 bp vor dem Startkodon des *rpoB*-Operons mit der 5'-RACE-Technik detektiert (Abbildung 3.25). In der *Primer Extension* fanden diese 5'-Transkriptenden allerdings keine Bestätigung. Stattdessen terminierten im Wildtyp sowie in mC und mE kürzere Transkripte an den Positionen -241/3 (Abbildung 3.24, Primer-156). Womöglich handelt es sich um schnell prozessierte Transkripte von dem putativen Promotor *PrpoB*-292/-288. In der Sequenzierung der RACE-Klone konnten jedoch keine entsprechenden 5'-Enden kartiert werden. Der Nachweis der 5'-Enden an den Positionen -292/-288 erfolgte neben mC auch für den Wildtyp, mE- sowie die PEP-defiziente Mutante (Abbildung 3.25), was die Transkription durch die NEP nahelegt (Legen, 2002). Dafür würde das für einen NEP-Promotor charakteristische TATA-Motiv 7/11 bp vor den putativen

Transkriptionsstartstellen -292/-288 sprechen (Abbildung 3.26). Interessant ist hierbei, dass auch putative -35/-10-Boxen (TTGATA...TATAAC) eines PEP-Promotors in Sequenznähe von -292/-288 gefunden wurden. Darüber hinaus lässt das sowohl mit der *Primer Extension* als auch mit der 5'-RACE-Technik detektierte Primärtranskript mit der Initiation an Position -558/6 noch einen weiteren Promotor vermuten (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.27A, Primer-484). Das CGTA-Motiv für einen putativen Typ-I NEP-Promotor in Sequenznähe unterstützt diese Annahme (Abbildung 3.28). Auch das in Sequenznähe von -618 relativ zum Startkodon gefundene TATA-Motiv könnte auf einen NEP-Promotor schließen lassen (wt, mC, mE, Abbildung 3.27 und Abbildung 3.28, Primer-484), aber die Verifizierung durch die *Primer Extension* war nicht erfolgreich. Dennoch, im Unterschied zu Mais (PrpoB-147, Silhavy und Maliga, 1998a) wird im Tabak für die Transkription von *rpoB* nicht nur ein Transkriptionsinitiationsstart genutzt (PrpoB-344/3), sondern vielleicht mindestens zwei weitere (PrpoB-292/-288; PrpoB-558/6). Ob letztere die gleichen Aktivitäten wie PrpoB-344/3 aufweisen, blieb in dieser Arbeit ungeklärt. Im Fall des Mais-Promotors ist jedoch nicht auszuschließen, dass mit dem bisher verwendeten Satz an Primern keine zusätzlichen Promotoren für *rpoB* kartiert wurden. Interessanterweise initiierte ein 5'-Ende an der Position -285, welches ein Prozessierungsprodukt von einem Primärtranskript weiter stromaufwärts sein könnte (Silhavy und Maliga, 1998a).

Der putative *rpoB*-Promotor -292/-288 liegt genau in dem Bereich, für den in den Deletionsmutanten putative positive regulatorische Sequenzelemente vermutet wurden (Kapitel 4.2.1). Diese Beobachtung eröffnet die Möglichkeit durch Deletionen in diesem Bereich die Suche nach möglichen regulatorischen Elementen weiter einzugrenzen. Im Fall des ausgeschalteten NEP-Promotors PrpoB-344/3 in mC kam es möglicherweise zu einem vollständigen Umschalten von NEP- auf PEP-Transkription und somit zur Autoregulation der PEP-Expression. Das könnte die bisherige Annahme, dass PEP ausschließlich unter der Kontrolle von NEP steht, in Frage stellen. Um dies aufzuklären, sollte die Rolle von PrpoB-292/-288 im Wildtyp-Tabak vor dem Hintergrund folgender Fragen untersucht werden: Zu welchem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung ist dieser Promotor aktiv? Gibt es gewebsspezifische Unterschiede in der Nutzung von PrpoB-292/-288? Ist der Promotor auch in PEP-defizienten Δrpo -Tabakpflanzen aktiv? Sollte es sich hierbei tatsächlich um einen PEP-Promotor handeln, könnte ein damit möglicher autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus der PEP-Expression einen neuen Aspekt in der regulatorischen Interaktion zwischen plastomkodierten und kernkodierten RNA-Polymerasen sowie Chloroplastentranskription darstellen. Alternativ könnte aufgrund putativer

Promotorsequenzmotive auch NEP die Transkription an -292/-288 bzw. -558/6 initiieren und auf diese Weise die stabile Transkription von *rpoB* gewährleisten (Abbildung 3.22).

Das *rpoB*-Operon stellt mit seinen kodierenden PEP-Untereinheiten eine wichtige Regulationsstelle der Plastidentranskription dar. So ist es durchaus vorstellbar, dass mehrere Promotoren an der *rpoB*-Transkription beteiligt sind. Damit könnten auch die beobachteten Unterschiede zu den bekannten PEP-defizienten Mutanten erklärt werden (Kapitel 4.2.1). Des Weiteren könnten die neuen putativen Promotoren Aufschluss für die beobachtete verringerte Transkriptstabilität von *rpoB* geben (Abbildung 3.23A). Das kürzere Transkript von *PrpoB*-292/-288 besitzt nicht die 5'-UTR-Sequenz, die wiederum vom Wildtyp-NEP-Transkript (*PrpoB*-344/3) bereitgestellt wird. Das in der Mutante längere NEP-Transkript (*PrpoB*-558/6) enthält solche UTR-Sequenzen, die womöglich nach der RNA-Prozessierung für Translations- und andere regulatorische Prozesse benötigt werden. Die Gesamt-mRNA-Menge ist jedoch aufgrund fehlender Transkripte von *PrpoB*-344/3 im Vergleich zum Wildtyp verringert. Ungeklärt bleibt dann an dieser Stelle, warum in den Kontrollmutanten ebenso eine reduzierte Akkumulation von *rpoB*-Transkripten zu verzeichnen war.

Primer Extension- und 5'-RACE-Technik detektierten zwar noch andere 5'-Transkriptenden (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.27), aber das Fehlen von bekannten Promotorelementen ließen eher auf Prozessierungsprodukte schließen. Die tatsächliche Transkriptionsinitiation und der Promotor befinden sich womöglich weit stromaufwärts von *rpoB*. Es wurden jedoch mit Primern, die 5'-Bereiche weiter stromaufwärts erfassten, keine weiteren 5'-Transkripte detektiert. Damit ist jedoch deren Existenz nicht ausgeschlossen. Auf der Suche nach putativen Promotoren müssen Primer nicht selten innerhalb AT-reicher Regionen positioniert werden, wodurch die Bildung von Sekundärstrukturen begünstigt wird. Sekundärstrukturen der Primer stören wiederum die *Primer Extension*- und 5'-RACE-Technik und können auf diese Weise zu falsch negativen Ergebnissen führen. Weiterhin ist erforderlich, die durch 5'-RACE-Technik kartierten Transkriptionsinitiationsstellen durch eine unabhängige Technik zu überprüfen. Die Ribonuklease-Protektion von *in vitro* gekappten (*capped*) Transkripten ermöglicht die Detektion von primären 5'-Enden. Diese Methode nutzt aus, dass organelläre Transkripte, im Unterschied zu nukleären mRNAs, an ihren 5'-Enden *in vivo* nicht gekappt sind. Plastidäre Primärtranskripte, die 5'-Triphosphate tragen, stellen auf diese Weise Substrate für die Guanylyltransferase (*capping* Enzym) dar und können an den 5'-Enden mit dem GMP-Rest von [³²P]- α -GTP *in vitro* radioaktiv markiert bzw. „gekappt“ werden. In diesem Fall könnte Gesamt-Tabak-RNA gekappt und dann unter Verwendung von zu den genomischen Regionen mit den putativen Promotoren komplementären RNA-Sonden der Ribonuklease-Protektion unterworfen werden. Darüber hinaus sollten sich die in dieser

Arbeit detektierten putativen Transkriptionsinitiationsorte in einer Population von Transkripten verschiedener Längen widerspiegeln. Interessant ist hier, dass Legen (2002) in *Northern Blot* Analysen in der Tat unterschiedlich lange Transkripte im Wildtyp, mC und mE bereits nachweisen konnte. Ungeklärt blieb jedoch, von welchen 5'-Enden diese Transkripte stammten.

Das Umschalten auf verschiedene plastidäre Promotoren kann prinzipiell sowohl PEP- als auch NEP-RNA-Polymerasen betreffen und ist während der Entwicklung höherer Pflanzen zu beobachten (Allison et al., 1996; Serino und Maliga, 1998; Baumgartner et al., 1993; Sriraman et al., 1998a). Die Funktion des Umschaltens zwischen den beiden Transkriptionsmaschinerien dient vielleicht der Aufrechterhaltung des Transkriptionssystems und somit der normalen Pflanzenentwicklung. Ein Umschalten von NEP- auf einen PEP- bzw. NEP- (CATA) auf einen alternativen NEP-Promotor (TATA; CGTA) ist jedoch bisher noch nicht beschrieben worden, aber für den umgekehrten Fall. Nach dem „*promoter switch*“ Modell von Schweer et al. (2006) wird durch den Ausfall des *atpB*-PEP-Promotors in der Sigma-Faktor-*knockout*-Mutante (SIG6 für PEP, Arabidopsis) auf einen NEP-Promotor weit stromaufwärts von *atpB* umgeschaltet, um so dessen Transkription zu gewährleisten. Ähnliche NEP-Promotorelemente konnten auch in anderen, intergenischen Regionen des Arabidopsis-Plastoms (*rps12*, *trnE* und *trnQ*) sowie in anderen Pflanzen (Reis, Mais) beobachtet werden (Schweer et al., 2006). Da im Unterschied zur Δ SIG6-Mutante alle detektierten *rpoB*-Promotoren von einer plastidären RNA-Polymerase erkannt werden, scheint in der *rpoB-core*-Promotormutante kein sogenanntes SOS-Programm abzulaufen. Vielmehr sind mehrere Sicherheitsstellen für den Ausfall eines Promotors in der *rpoB*-Transkription eingebaut. Auch in Arabidopsis wurde mittels 5'-RACE-Technik neben dem bekannten *rpoB*-Promotor -300 noch eine weitere putative Transkriptionsinitiationsstelle für die NEP weiter stromaufwärts kartiert (-376, persönliche Mitteilung von M. Swiatecka-Hagenbruch). Unabhängig davon detektierten Courtois et al. (2007) einen bisher unbekannten *rpoB*-Promotor (*PrpoB*-538) in Arabidopsis, der auch unter Kontrolle von NEP steht.

Nicht vollständig verstanden bleibt in dieser Arbeit, warum sich Deletionen, die den Bereich der putativen Promotoren (*PrpoB*-618, *PrpoB*-558/6) erfassen, nicht auf die Transkription sowie Transkriptakkumulation der Reportergene GUS bzw. GFP in den NtSH-Mutanten auszuwirken scheinen (Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18). Möglicherweise sind die Gründe in der Konstruktion der Insertionskassetten sowie der Transformation zu suchen (Kapitel 4.2.1). So umfassten die Transkripte durch vorzeitige Termination womöglich erst

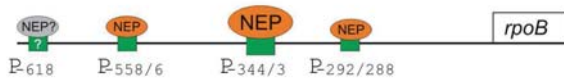
gar nicht die kodierende Region und wurden deshalb mit *run-on*-Transkriptionsassays und quantitativer *real-time* RT-PCR nicht erfasst. Alternativ spielen die Sequenzen im Tabak-Wildtyp keine Rolle oder werden nur zu einem geringen Anteil genutzt.

4.2.3 Modell: Transkription von *rpoB*

Wie wird die Transkription von *rpoB* reguliert? Im Wildtyp wird die Transkription von *rpoB* hauptsächlich an der Position -344/3 relativ zum Startkodon initiiert (Abbildung 4.2, Modell A). Zu einem geringeren Anteil findet auch die Initiation an den Promotoren *PrpoB*-558/6 und *PrpoB*-292/288 durch NEP statt. In der Mutante mC wird aufgrund der Punktmutation im *rpoB*-core-Promotormotiv *PrpoB*-344/3 nicht mehr genutzt. Die Transkription von *rpoB* wird durch die Steigerung der Aktivität von *PrpoB*-558/6 und *PrpoB*-292/288 aufrechterhalten (Abbildung 3.22). Die daraus resultierenden unterschiedlich langen Transkripte beeinflussen womöglich die Transkriptstabilität (Abbildung 3.23A). Alternativ weisen im Wildtyp alle drei Promotoren die gleiche Aktivität auf (Abbildung 4.2, Modell B). Der Ausfall von *PrpoB*-344/3 hat keine weiteren Folgen. Die Transkription wird an den anderen, aktiven Promotoren initiiert. Obwohl die fehlende Aktivität von *PrpoB*-299/288 in der PEP-defizienten $\Delta rpoA$ -Tabakmutante einen NEP-Promotor nahelegt, lassen jedoch die eubakteriellen Promotormotive in dessen Sequenznähe auch eine mögliche PEP-Aktivität vermuten. So ist vorstellbar, dass in der frühen Entwicklung der Pflanze NEP die Transkription von *rpoB* gewährleistet. Ist eine ausreichende Menge an PEP vorhanden, kann PEP im Zusammenspiel von NEP über autoregulatorische Rückkopplungsschleifen ihre eigene Expression regulieren (Abbildung 4.2, Modell C). Damit wäre die einfache Regulation der PEP-Expression durch die NEP in Frage gestellt. Mehrere Promotoren gewährleisten die *rpoB*-Transkription. Die Hinweise auf mögliche Transkriptionsfaktoren werden durch die hier durchgeführten Promotor-Deletionsstudien unterstützt. Der zufolge sind in der *rpoB* 5'-UTR (+6 bis +339 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle) vielleicht Sequenzelemente für die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren von bisher unbekannter Identität lokalisiert. Aber auch weiter stromaufwärts von -277 relativ zum Transkriptionsstartpunkt gelegene Sequenzmotive könnten Interaktionsbereiche für allgemeine, aber möglicherweise auch Cytokinin-regulierte Transkriptionsfaktoren sein (Abbildung 4.2; Modell D).

Modell A

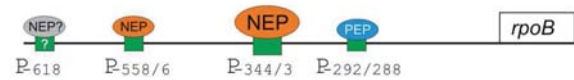
Wt



mC

**Modell C**

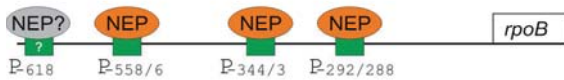
Wt



mC

**Modell B**

Wt



mC

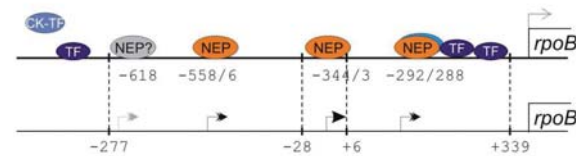
**Modell D: Putative Transkriptionsfaktoren**

Abbildung 4.2: Modell für die Regulation der *rpoB*-Transkription. Die Transkription von *rpoB* wird nach Ausschalten von *PrpoB*-344/3 an benachbarten Promotoren weitergeführt. Der durch 5'-RACE-Technik kartierte Transkriptionsinitiationsort an Position -618 relativ zum Startkodon (*PrpoB*-618) ist bisher durch *Primer Extension* nicht verifiziert worden. Promotor-Deletionsmutanten gaben Hinweise auf putative Sequenzelemente im Bereich von +6 bis +339 relativ zur Transkriptionsinitiationsstelle. Dieser Abschnitt schließt *PrpoB*-292/-288 ein (Modell D). Darüber hinaus könnten allgemeine, aber auch Cytokinin-regulierte Transkriptionsfaktoren (CK-TF) mit Sequenzelementen stromaufwärts von -277 interagieren. Details im Text.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abdelghani, M.O. , Suty, .L, Chen, J.N., Renaudin, J.P. und Teyssendier de la Serve, B. (1991) Cytokinins modulate the steady-state levels of light-dependent and light-independent proteins and mRNAs in tobacco cell suspensions. *Plant Science* **77**, 29–40
- Abeles, F., Morgan, P. und Saltveit, M. Jr. (1992) Ethylene in Plant Biology. (*San Diego: Academic Press*)
- Adamaska, I. und Klopstech, K. (1994) Low temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress conditions. . *J Biol Chem* **269**, 30221-30226
- Allison, L. A. (2000) The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* **82**(6-7), 537-548
- Allison, L. A. und Maliga, P. (1995) Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter. *EMBO Journal* **14**, 3721-3730
- Allison, L.A., Simon, L.D. und Maliga, P. (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO Journal* **15**, 2802-2809
- Andersen, B. R., Jin, G., Chen, R., Ertl, J. R. und Chen, C.-M. (1996) Transcriptional regulation of hydroxypyruvate reductase gene expression by cytokinin in etiolated pumpkin cotyledons *Planta* **198**, 1-5
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G., Margalit, H. und Altuvia, S. (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* **11**(12), 941-950
- Armstrong, D.J. (1994) Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*, ed DWS Mok, MC Mok, Boca Raton, Florida: CRC Press, 139–154
- Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., Chua, N.-H. und Sandberg, G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *PNAS* **97**(26), 14778-14783
- Auer, C.A., Motyka, V., Brezinová, A. und Kamínek, M. (1999) Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Petunia hybrida*. . *Physiol Plant* **105**, 141-147
- Baena-Gonzalez, Elena, Baginsky, Sacha, Mulo, Paula, Summer, Holger, Aro, Eva-Mari und Link, Gerhard (2001) Chloroplast Transcription at Different Light Intensities. Glutathione-Mediated Phosphorylation of the Major RNA Polymerase Involved in Redox-Regulated Organellar Gene Expression. *Plant Physiology* **127**(3), 1044-1052
- Baeza, L., Bertrand, A., Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1991) Characterization of a protein binding sequence in the promoter region of the 16S rRNA gene of the spinach chloroplast genome. *Nucleic Acids Research* **19**, 3577-3581
- Barber, J. und Andersson, B. (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* **17**, 61-66
- Baumgartner, B.J., Rapp, J.C. und Mullet, J.E. (1989) Plastid transcription activity and DNA copy number increase early in barley chloroplast development *Plant Physiology* **89**(3), 1011–1018
- Baumgartner, B.J., Rapp, J.C. und Mullet, J.E. (1993) Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development: evidence for selective stabilization of *psbA* mRNA. *Plant Physiology* **101**, 781-791
- Benková, E., Witters, E., Van Dongen, W., Kolár, J., Motyka, V., Brzobohaty, B., Van Onckelen, H. A. und Machácková, I. (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiology* **121**(1), 245-252
- Bensing, B. A., Meyer, B. J. und Dunny, G. M. (1996) Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(15), 7794-7799

- Bernier, G. (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotech J* **3**, 3
- Binns, A. N. (1994) Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**, 173-196
- Bleecker, A.B. und Patterson, S.E. (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis. *Plant Cell* **9**(1169-1161)
- Bligny, M., Courtois, F., Thaminy, S., Chang, C.C., Lagrange, T., Baruah-Wolff, J., Stern, D. und Lerbs-Mache, S. (2000) Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO Journal* **19**(8), 1851-1860
- Boffey, S.A. und Leech, R.M. (1982) Chloroplast DNA Levels and the Control of Chloroplast Division in Light-Grown Wheat Leaves. *Plant Physiology* **69**, 1387-1391
- Bohne, A.-V., Ruf, S., Börner, T. und Bock, R. (2007) Faithful transcription initiation from a mitochondrial promoter in transgenic plastids. *Nucleic Acids Research* **35**(21), 7256-7266
- Bonetta, D. und McCourt, P. (1998) Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends Plant Science* **3**, 231-235
- Bown, J., Barne, K., Minchin, S. und Busby, S. (1997) Extended -10 promoters. *Nucleic Acids Mol Biol* **11**, 41-52
- Boyes, Douglas C., Zayed, Adel M., Ascenzi, Robert, McCaskill, Amy J., Hoffman, Neil E., Davis, Keith R. und Gorchach, Jorn (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**(7), 1499-1510
- Bracale, M., Longo, G.P., Rossi, G. und Longo, C.P. (1988) Early changes in morphology and polypeptide pattern of plastids from watermelon cotyledons induced by benzyladenine or light are very similar. *Physiologia Plantarum* **72**, 94-100
- Bradford, K.J. und Trewavas, A.J. (1994) Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiology* **105**, 1029-1036
- Brandstatter, I. und Kieber, J. J. (1998) Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1009-1019
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Kollmer, I., Burkle, L. und Schmölling, T. (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant Journal* **44**(2), 314-333
- Bungard, R.A. (2004) Photosynthetic evolution in parasitic plants: insight from the chloroplast genome. *Bioessays* **26**, 235-247
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C. und Frommer, W.B. (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. *The Plant Journal* **34**, 13-26
- Caers, Marleen und Vendrig, J. C. (1986) Benzyladenine effects on the development of the photosynthetic apparatus in *Zea mays*: studies on photosynthetic activity, enzymes and (etio)chloroplast ultrastructure. *Physiologia Plantarum* **66**(4), 685-691
- Cavalier-Smith, T. (1991) Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends Genetics* **5**, 145-148
- Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S. und Dennis, E.S. (1993) amp1 - a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant Journal* **4**, 907-916

- Chawade, A., Bräutigam, M., Lindlöf, A., Olsson, O. und Olsson, B. (2007) Putative cold acclimation pathways in *Arabidopsis thaliana* identified by a combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. *BMC Genomics* **8**, 304
- Che, P., Gingerich, D. J., Lall, S. und Howell, S. H. (2002) Global and hormone-induced gene expression changes during shoot development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 2771-2785
- Cheetham, G.M. und Steitz, T.A. (2000) Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 117-123
- Chin-Atkins, A.N., Craig, S., Hocart, C.H., Dennis, D.S. und Chaudhury, A.M. (1996) Increased endogenous cytokinin in the *Arabidopsis* amp1 mutant corresponds with de-etiolation responses. *Planta* **198**, 549-556
- Choquet, Yves und Wollman, Francis-André (2002) Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression. *FEBS Letters* **529**(1), 39-42
- Chory, J. (1994) Plant phototransduction. Phytochrome signal transduction. *Current Biology* **4**, 844-846
- Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T. und Brenner, M. (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (*det* mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology* **104**(2), 339-347
- Christopher, D. A. und Mullet, J. E. (1994) Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiology* **104**(4), 1119-1129
- Clark, D.G., Dervinis, C. , Barrett, J.E. , Klee, H. und Jones, M. (2004) Drought-induced leaf senescence and horticultural performance of transgenic PSAG12-IPT petunias. *J Amer Soc Hort Sci* **129**, 93-99
- Coenen, C. und Lomax, T.L. (1997) Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Science* **2**, 351-356
- Colijn, C.M., Sijmons, P., Mol, J.M.M., Kool, A.J. und Nijkamp, H.J.J. (1982) Light and benzylaminopurine induce changes in ultrastructure and gene expression in plastids of *Petunia hybrida* cell cultures. *Current Genetics* **6**, 129-135
- Cotney, Justin und Shadel, Gerald, S. (2006) Evidence for an early gene duplication event in the evolution of the mitochondrial transcription factor B family and maintenance of rRNA methyltransferase activity in human mtTFB1 and mtTFB2. *Journal of Molecular Evolution* **V63**(5), 707-717
- Cotton, J. L. S., Ross, C. W., Byrne, D. H. und Colbert, J. T (1990) Down-regulation of phytochrome mRNA abundance by red light and benzyladenine in etiolated cucumber cotyledons. *Plant Molecular Biology* **14**, 707-714
- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (2007) Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* Operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**, 712-721
- D'Agostino, I.B. und Kieber, J.J. (1999) Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators *Trends Biochemical Science* **24**, 452-456
- D'Agostino, I.B., Deruere, J. und Kieber, J.J. (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* **124**, 1706-1717
- Davey, J.E. und Van Staden, J. (1981) Cytokinins in spinach chloroplasts. *Annals of Botany* **48**, 243-246
- De Santis-Maciossek, G., Kofer, W., Bock, A., Schoch, S., Maier, R.M., Wanner, G., Rudiger, W., Koop, H.U. und Herrmann, R.G. (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant Journal* **18** ((5)), 477-489
- Deikman, J. (1997) Elucidating cytokinin response mechanisms using mutants. *Plant Growth Regul* **23**, 33-40
- Deikman, J. und Hammer, P. E. (1995) Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **108**, 47-57

- Delannoy, E., Stanley, W.A., Bond, C.S. und Small, I.D. (2007) Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochemical Society Transactions* **35**(6), 1643-1647
- Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad, M., Rembur, J., Noin, M., Chiriqui, D., Van Onckelen, H. (1999) Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiol* **119**, 111-121
- Dietzel, L., Bräutigam, K. und Pfannschmidt, T. (2008) Photosynthetic acclimation: State transitions and adjustment of photosystem stoichiometry - functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS Journal* **275**, 1080-1088
- Drescher, Anja, Ruf, Stephanie, Calsa, Tercilio, Carrer, Helaine und Bock, Ralph (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant Journal* **22**(2), 97-104
- Eklöf, S., Åstot, C., Blackwell, J., Moritz, T., Olsson, O. und Sandberg, G. (1997) Auxin-cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. *Plant Cell Physiology* **38**(3), 225-235
- Estruch, J.J., Prinsen, E., Onckelen, H.V., Schel, J. und Spena, A. (1991) Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokininsynthesizing gene. *Science* **254**, 1364
- Fernández, A.P. und Strand, A. (2008) Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 509-513
- Ferreira, Fernando J. und Kieber, Joseph J. (2005) Cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(5), 518-525
- Flores, Susan und Tobin, Elaine M. (1986) Benzyladenine modulation of the expression of two genes for nuclear-encoded chloroplast proteins in *Lemna gibba*: apparent post-transcriptional regulation. *Planta* **168**(3), 340-349
- Foyer, C.H., Noctor, G., Buchanan, B., Dietz, K.J. und Pfannschmidt, T. (2009) Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**(4), 861-905
- Franco-Zorrilla, J.M., Gonzalez, E., Bustos, R., Linhares, F., Leyva, A. und Paz-Ares, J. (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *Journal of Experimental Botany* **55**, 285-293
- Franco-Zorrilla, J.M., Martín, A.C., Leyva, A und Paz-Ares, J. (2005) Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiology* **138**, 847-857
- Franco-Zorrilla, J.M., Martín, A.C., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A. und Paz-Ares, J. (2002) Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* **32**, 353-360
- Frank, M., Rupp, H.-M., Prinsen, E., Motyka, V. und Van Onckelen, H. (2000) Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of Arabidopsis with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiology* **122**, 721-729
- Gamble, P. E. und Mullet, J. E. (1989) Blue light regulates the accumulation of two *psbD-psbC* transcripts in barley chloroplasts. *EMBO Journal* **8**(10), 2785-2794
- Gan, S. und Amasino, R. M. (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiology* **113**, 313-319
- Gan, S. und Amasino, R.M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988

- Gazzarini, S. und McCourt, P. (2003) Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Ann Bot* **91**, 605-612
- Ghassemian, M., Lutes, J., Chang, H.-S., Lange, I., Chen, W., Zhu, T., Wang, X. und Lange, B.M. (2008) Abscissic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* **69**, 2899-2911
- Gillissen, B., Burkle, L., André, B., Kuhn, C., Rentsch, D., Brandl, B. und Frommer, W. B. (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 291-300
- Golovko, A., Sitbon, F., Tillberg, E. und Nicander, B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **49**, 161-169
- Gould, K.S. (2004) Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *J Biomed Biotechnol* **5**, 314-320
- Gray, M. W. (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* **141**, 233-357
- Gray, M.W. (1993) Origin and evolution of organelle genomes. *Current Opinion In Genetics And Development* **3**(6), 884-890
- Gray, M.W. und Lang, B.F. (1998) Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases. *Trends In Microbiology* **6**(1), 1-3
- Gruissem, W und Tonkyn, J. C. (1993) Control mechanisms of plastid gene expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**, 19-55
- Gruissem, W., Barkan, A., Deng, X. W. und Stern, D. (1988) Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *Trends in Genetics* **4**(9), 258-263
- Gruissem, W., Greenberg, B. M., Zurawski, G. und Hallick, R. B. (1986) Chloroplast gene expression and promoter identification in chloroplast extracts. *Methods in Enzymology* **118**, 253-270
- Haberer, G. und Kieber, J. J. (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol* **128**, 354-362
- Hajdukiewicz, P.T.J., Allison, L.A. und Maliga, P. (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO Journal* **16**(13), 4041-4048
- Hande, S. und Jayabaskaran, C. (1996) Cucumber chloroplast *trnL*(CAA) gene - nucleotide sequence and *in vivo* expression analysis in etiolated cucumber seedlings treated with benzyladenine and light. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **33**(6), 448-454
- Hansen, C.E., Meins, F. und Aebi, R. (1987) Hormonal regulation of zeatin riboside accumulation by cultured tobacco cells. *Planta* **172**, 520-525
- Hare, P.D. und Van Staden, J. (1997a) The molecular basis of cytokinin action. *Plant Growth Regulator* **23**, 41-78
- Hare, P.D. und Van Staden, J. (1997b) The molecular basis of cytokinin action. *Plant Growth Regulator* **23**, 41-78
- Harrar, Y., Bellec, Y., Bellini, C. und Faure, J.-D. (2003) Hormonal control of cell proliferation requires PASTICCINO genes. *Plant Physiology* **132**, 1217-1227
- Harvey, B. M. R., Lu, B. C. und Fletcher, R. A. (1974) Benzyladenine accelerates chloroplast differentiation and stimulates photosynthetic enzyme activity in cucumber cotyledons. *Canadian Journal of Botany* **52**(12), 2581-2586
- Hedtke, B., Börner, T. und Weihe, A. (1997) Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in Arabidopsis. *Science* **277**(5327), 809-811

- Herrin, David L. und Nickelsen, Jörg (2004) Chloroplast RNA processing and stability. *Photosynthesis Research* **82**(3), 301-314
- Herrmann, R. G. (1997) Eukaryotism, towards a new interpretation. In *Schenk, H E A, Hermann, R G, Jeon, K W, Müller, N E, Schwemmler, W (eds) Eukaryotism and Symbiosis Springer-Verlag, Berlin*, 73-118
- Hess, W. R. und Börner, T. (1999) Organellar RNA polymerases of higher plants. *International Review of Cytology* **190**, 1-59
- Hewett, E.W. und Wareing, P.F. (1973) Cytokinins in *Populus x robusta* (Schneid): Light effects on endogenous levels. *Planta* **114**, 119-129
- Hirose, N. , Makita, N., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology* **138**, 196-206
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H. und Sakakibara, H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**(1), 75-83
- Hoffman, T., Schmidt, J.C., Zheng, X. und Bent, A.F. (1999) Isolation of ethyleneinsensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for- gene disease resistance. *Plant Physiology* **119**, 935-949
- Hoth, S., Ikeda, Y., Morgante, M., Wang, X., Zuo, J., Hanafey, M. K., Gaasterland, T., Tingey, S. V. und Chua, N. H. (2003) Monitoring genome-wide changes in gene expression in response to endogenous cytokinin reveals targets in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **554**(3), 373-380
- Howe, C. J., Beanland, T. J., Larkum, A. W. D., Lockhart, P. J. (1992) Plastid origins. *Trends Ecol Evol* **7**, 378-383
- Huang, S., Cerny, R.E., Qi, Y., Bhat, D., Aydt, C.M., Hanson, D.D., Malloy, K.P. und Ness, L.A. (2003) Transgenic studies on the involvement of cytokinin and gibberellin in male development. *Plant Physiology* **131**, 1270-1282
- Hübschmann, T. und Börner, T. (1998) Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant Molecular Biology* **36**(3), 493-496
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Klopstech, K. und Havaux, M. (2003) Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4921-4926
- Hwang, Ildoo und Sheen, Jen (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**(6854), 383-389
- Iamtham, S. und Day, A. (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnology* **18**, 1172-1176
- Igloi, G.L. und Kössel, H. (1992) The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Critical Reviews in Plant Sciences* **10**, 525-558
- Imamura, A., Hanaki, N., Umeda, H. und Nakamura, A. T. S. C. U. T. M. (1998) Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 2691-2696
- Inada, H. , Kusumi, K. , Nishimura, M. und Iba, K. (1996) Specific expression of the chloroplast gene for RNA polymerase (*rpoB*) at an early stage of leaf development in rice. *Plant & Cell Physiology* **37**(2), 229-232
- Inada, H. , Seki, M. , Morikawa, H. , Nishimura, M. und Iba, K. (1997) Existence of three regulatory regions each containing a highly conserved motif in the promoter of plastid-encoded RNA polymerase gene (*rpoB*). *Plant Journal* **11**(4), 883-890
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K. und Kakimoto, T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis* *Nature* **409**, 1060-1063

- Iratni, R., Diederich, L., Harrak, H., Bligny, M. und Lerbs-Mache, S. (1997) Organ-specific transcription of the *rrn* operon in spinach plastids. *Journal of Biological Chemistry* **272**(21), 13676-13682
- Iratni, R., Baeza, L., Andreeva, A., Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (1994) Regulation of rDNA transcription in chloroplasts: promoter exclusion by constitutive repression. *Genes & Development* **8**, 2928-2938
- Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokota, A. und Kobayashi, H. (1997) Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of sigma70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**(26), 14948-14953
- Jackowski, G., Jarmolowski, A. und Szweykowska, A. (1987) Kinetin modifies the secondary structure of poly(A)RNA in cucumber cotyledons. *Plant Science* **52**, 67-70
- Jeffcoat, B. (1977) Influence of cytokinin, 6-benzylamino-9-(tetrahydropyran-2-yl)- 9H-purine on the growth and development of some ornamental crops *J Hort Sci* **52**, 143-153
- Jenks, M. und Hasegawa, P. (2005) Plant Abiotic Stress. *Blackwell Publishing, Oxford*
- Jiang, C.Z., Rodermel, S.R. und Shibles, R.M. (1993) Photosynthesis, Rubisco activity and amount, and their regulation by transcription in senescing Soybean leaves. *Plant Physiology* **101**, 105-112
- Kakimoto, T. (1996) CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985
- Kakimoto, T. (2001a) Biosynthesis and perception of cytokinins (abstract). In 17th International Conference on Plant Growth Substances Brno, Czech Republic, July 1-6, **56**
- Kakimoto, T. (2001b) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl- diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol* **42**, 677-685
- Kakimoto, Tatsuo (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **54**(1), 605-627
- Kapoor, S., Suzuki, J. Y. und Sugiura, M. (1997) Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant Journal* **11**(2), 327-337
- Kapoor, S., Wakasugi, T., Deno, H. und Sugiura, M. (1994) An *atpE*-specific promoter within the coding region of the *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA. *Current Genetics* **26**(3), 263-268
- Kasahara, Hiroyuki, Takei, Kentaro, Ueda, Nanae, Hishiyama, Shojiro, Yamaya, Tomoyuki, Kamiya, Yuji, Yamaguchi, Shinjiro und Sakakibara, Hitoshi (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(14), 14049-14054
- Kasten, B., Buck, F., Nuske, J. und Reski, R. (1997) Cytokinin affects nuclear- and plastome-encoded energy-converting plastid enzymes. *Planta* **201**(3), 261-272
- Kasten, B., Wehe, M., Kruse, S., Reutter, K., Abel, W. O. und Reski, R. (1992) The plastome-encoded *zfpA* gene of a moss contains procaryotic as well as eucaryotic promoter consensus sequences and its RNA abundance is modulated by cytokinin. *Current Genetics* **22**(4), 327-333
- Kestermann, M., Neukirchen, S., Kloppstech, K. und Link, G. (1998) Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Research* **26**(11), 2747-2753
- Khandelwal, A., Elvitigala, T., Ghosh, B. und Quatrano, R.S. (2008) Arabidopsis Transcriptome Reveals Control Circuits Regulating Redox Homeostasis and the Role of an AP2 Transcription Factor. *Plant Physiology* **148**, 2050-2058
- Khokhlova, V.A., Karavaiko, N.N., Podergina, T.A. und Kulaeva, O.N. (1978) The antagonistic effect of abscisic acid and cytokinin on the structural and biochemical differentiation of chloroplasts in isolated pumpkin cotyledons. *Tsitologiya (Leningrad)* **XX**, 1033-1039

- Kiba, T., Taniguchi, M., Imamura, A., Ueguchi, C., Mizuno, T. und Sugiyama, T. (1999) Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **40**, 767–771
- Kim, Byung-Hoon und von Arnim, Albrecht (2006) The Early Dark-Response in *Arabidopsis thaliana* Revealed by cDNA Microarray Analysis. *Plant Molecular Biology* **60**(3), 321–342
- Kim, Hyo Jung, Ryu, Hojin, Hong, Sung Hyun, Woo, Hye Ryun, Lim, Pyung Ok, Lee, In Chul, Sheen, Jen, Nam, Hong Gil und Hwang, Ildoo (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *PNAS* **103**(3), 814–819
- Kim, M. und Mullet, J. E. (1995) Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive *psbD-psbC* promoter. *Plant Cell* **7**, 1445–1457
- Kimura, M., Yamamoto, Y.Y., Seki, M., Sakurai, T., Sato, M., Abe, T., Yoshida, S., Manabe, K., Shinozaki, K. und Matsui, M. (2003) Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochem Photobiol* **77**, 226–233
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsushashi, W., Toyomasu, T. und Koshiba, T. (2004) Tissue specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, ACO3, in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 1697–1707
- Kraepiel, Y. und Miginiac, E. (1997) Photomorphogenesis and phytohormones. *Plant, Cell & Environment* **20**(6), 807–812
- Krause, K., Maier, R. M., Kofer, W., Krupinska, K. und Herrmann, R. G. (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Molecular and General Genetics* **263**(6), 1022–1030
- Krupinska, K. und Humbeck, K. (2004) Photosynthesis and chloroplast breakdown. In: *Noodén LD (ed) Plant Cell Death Processes, Elsevier Science (USA), Academic Press, London, UK* 169–187
- Kühn, K. (2006) Analysis of components of the mitochondrial transcription machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Disseration, HU Berlin, Berlin*
- Kühn, Kristina, Bohne, Alexandra-Viola, Liere, Karsten, Weihe, Andreas und Börner, Thomas (2007) *Arabidopsis* phage-type RNA polymerases: accurate *in vitro* transcription of organellar genes. *Plant Cell* **19**(3), 959–971
- Kühn, Kristina, Weihe, Andreas und Börner, Thomas (2005) Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* **33**(1), 337–346
- Kulaeva, O.N., Burkhanova, E.A., Karavaiko, N.N., Selivankina, S.Y., Porfirova, S.A., Maslova, G.G., Zemlyachenko, Y.V. und Börner, T. (2002) Chloroplasts affect the leaf response to cytokinin. *Journal of Plant Physiology* **159**(12), 1309–1316
- Kulaeva, O.N., Karavaiko, N.N., Selivankina, S.Y., Kusnetsov, V.V., Zemlyachenko, Y.V., Cherepneva, G.N., Maslova, G.G., Lukevich, T.V., Smith, A.R. und Hall, M.A. (2000) Nuclear and chloroplast cytokinin-binding proteins from barley leaves participating in transcription regulation. *Plant Growth Regulation* **32**(2), 329–335
- Kumar, V., Mills, D.J., Anderson, J.D. und Mattoo, A.K. (2004) An alternative agriculture system is defined by a distinct expression profile of select gene transcripts and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 10535–10540
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. und Kyojuka, J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655
- Kurapov, P.B., Skorobogatova, I.V., Sal'nikova, E.I., Sorkina, G.L. und Siusheva, A.G. (2000) Diurnal courses of endogenous phytohormones in barley. *Izvestiya Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya* **1**, 108–114
- Kusnetsov, V., Herrmann, R.G., Kulaeva, O.N. und Oelmüller, R. (1998) Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expression of the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase. *Molecular and General Genetics* **259**(1), 21–28

- Kusnetsov, V. V., Oelmüller, R., Sarwat, M. I., Porfirova, S. A., Cherepneva, G. N., Herrmann, R. G. und Kulaeva, O. N. (1994) Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels. *Planta* **194**(3), 318-327
- Lambowitz, A.M. und Belfort, M. (1993) Introns as mobile genetic elements. *Annu Rev Biochem* **62**, 587-622
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. und Gray, M.W. (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**(6632), 493-497
- Larkindale, J. und Vierling, E. (2008) Core Genome Responses Involved in Acclimation to High Temperature. *Plant Physiology* **146**, 748-761
- Legen, Julia (2002) Gene expression in plastids of higher plants: evolutionary and functional aspects of different RNA polymerases – coordinated assembly of multiproteincomplexes. Dissertation, LMU München
- Legen, Julia, Kemp, Sabine, Krause, Kirsten, Profanter, Birgit, Herrmann, Reinhold G. und Maier, Rainer M. (2002) Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant Journal* **31**(2), 171-188
- Lejeune, P., Kinet, J.-M. und Bernier, G. (1988) Cytokinin fluxes during floral induction in the long day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiology* **86**, 1095-1098
- Lerbs, S., Lerbs, W., Klyachko, N. L., Romanko, E. G., Wollgiehn, R. und Parthier, B. (1984) Gene expression in cytokinin- and light-mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* **162**(4), 289-298
- Letham, D. S. (1994) Cytokinins as phytohormones - sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. . In *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, DWS Mok and MC Mok, eds (Boca Raton, USA: CRC Press), 57-80
- Letham, D.S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. . *Life Science* **8**, 569-573
- Leung, J. und Giraudat, J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 199-222
- Levitt, J. (1972) Responses of Plants to Environmental Stresses. *Academic Press New York*
- Li, Y. , Hagen, G. und Guilfoyle, T.J. (1992) Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. *Developmental Biology* **153**, 386-395
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B. und Niyogi, K.K. (2008) Sensing and responding to excess light. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 239-260
- Liere, K. und Maliga, P. (1999a) *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO Journal* **18**(1), 249-257
- Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007a) Transcription and transcriptional regulation in plastids. In *Topics in Current Genetics: Cell and Molecular Biology of Plastids*, Bock, R (ed), Vol. 20, p in preparation. Berlin / Heidelberg: Springer
- Liere, Karsten und Börner, Thomas (2007b) Transcription of plastid genes. In *Regulation of Transcription in Plants*, Grasser, KD (ed), pp 184-224. Oxford: Blackwell Publishing
- Liere, Karsten und Maliga, Pal (1999b) Novel *in vitro* transcription assay indicates that the *accD* NEP promoter is contained in a 19 bp fragment. In *The Chloroplast: From Molecular Biology to Biotechnology*, Argyroudi-Akoyunoglou, JH und Senger, H (eds), pp 79-84. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers
- Liere, Karsten und Maliga, Pal (2001) Plastid RNA Polymerases. In *Regulation of Photosynthesis*, Andersson, B und Aro, E-M (eds), pp 29-49. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Lim, P.O., Kim, H.J. und Nam, H.G. (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 115-136

- Lim, P.O., Woo, H.R. und Nam, H.G. (2003) Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Science* **8**, 272–278
- Lin, C. und Shalitin, D. (2000) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 469–496
- Link, G. (1988) Photocontrol of plastid gene expression. *Plant Cell Environ* **11**, 329–338
- Link, G. (1994) Plastid differentiation: organelle promoters and transcription factors. In *Plant Promoters and Transcription factors - Results & Problems in Cell Differentiation*, Nover, L (ed), Vol. 20, pp 65–85. Berlin: Springer Verlag
- Longo, G.P., Pedretti, M., Rossi, G. und Longo, C.P. (1979) Effect of benzyladenine on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. *Planta* **145**, 209–217
- Lu, J., Ertl, J. R. und Chen, C. (1990) Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. *Plant Molecular Biology* **14**, 585–594
- Lukevich, T.V., Kusnetsov, V.V., Karavaiko, N.N., Kulaeva, O.N. und Selivankina, S.Y. (2002) The involvement of the chloroplast zeatin-binding protein in hormone-dependent transcriptional control of the chloroplast genome. *Russian Journal Plant Physiology* **49**, 92–98
- Lysenko, E. A. und Kuznetsov, V. V. (2005) Plastid RNA Polymerases. *Molecular Biology* **V39**(5), 661–674
- Lysenko, E.A. (2007) Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant Cell Report* **26**, 845–859
- Lyukevich, T.V., Kusnetsov, V.V., Karavaiko, N.N., Kulaeva, O.N. und Selivankina, S.Y. (2002a) The involvement of the chloroplast zeatin-binding protein in hormone-dependent transcriptional control of chloroplast genome. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**, 92–98
- Lyukevich, T.V., Kusnetsov, V.V., Karavaiko, N.N., Kulaeva, O.N. und Selivankina, S.Y. (2002b) The involvement of the chloroplast zeatin-binding protein in hormone-dependent transcriptional control of chloroplast genome. *Russian Journal of Plant Physiology* **49**, 92–98
- Macháková, I., Konstantinova, T.N., Sergeeva, L.I., Lozhnikova, V.N., Golyanovskaya, S.A., Dudko, N.D., Eder, J. und Aksenova, N.P. (1998) Photoperiodic control of growth, development and phytohormone balance in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* **102**, 272–278
- MacKenzie, J.M. Jr., Coleman, R.A., Briggs, W.R. und Pratt, L.H. (1975) Reversible redistribution of phytochrome within the cell upon conversion to its physiologically active form. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 799–803
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N. und Helariutta, Y. (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes and Development* **14**, 2938–2943
- Maliga, P. (1998) Two plastid polymerases of higher plants: an evolving story. *Trends in Plant Science* **3**(1), 4–6
- Martin, W. und Herrmann, R. G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why. *Plant Physiology* **118**, 9–17
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T. und Takahashi, H. (2004) Induction of SULTR1;1 sulfate transporter in Arabidopsis roots involves protein phosphorylation/dephosphorylation circuit for transcriptional regulation. *Plant and Cell Physiology* **45**, 340–345
- Masuda, Tatsuru, Tanaka, Ryoichi, Shioi, Yuzo, Takamiya, Ken-ichiro, Kannangara, C. Gamini und Tsuji, Hideo (1994) Mechanism of benzyladenine-induced stimulation of the synthesis of 5-aminolevulinic acid in greening cucumber cotyledons: benzyladenine increases levels of plastid tRNA^{Glu}. *Plant & Cell Physiology* **35**(2), 183–188
- Matsuo, T., Onai, K., Okamoto, K., Minagawa, J. und Ishiura, M. (2006) Real-time monitoring of chloroplast gene expression by a luciferase reporter: evidence for nuclear regulation of chloroplast circadian period. *Mol Cell Biol* **26**(3), 863–870

- McKenzie, M.J., Mett, V., Reynolds, P.H.S. und Jameson, P.E. (1998) Controlled cytokinin induction in transgenic tobacco using a copper inducible promoter. *Plant Physiology* **116**, 969-977
- Miller, C.O. (1956) Similarity of some kinetin and red light effects. . *Plant Phys* **31**, 318-319
- Miller, C.O. , Skoog, F. , von Saltza, M.H. und Strong, F.M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. . *J Am Chem Soc* **77**, 1392-1393.
- Miller, C.O., Skoog, F., Okomura, F., von Saltza, M.H. und Strong, F.M. (1956) Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. . *J Am Chem Soc* **78**, 1375-1380
- Miyagi, T., Kapoor, S., Sugita, M. und Sugiura, M. (1998) Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpI/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpI* coding sequence. *Mol Gen Genet* **257**(3), 299-307
- Miyamoto, T., Obokata, J. und Sugiura, M. (2002) Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of cis-acting elements and trans-acting factors involved in RNA editing in tobacco and pea chloroplasts. *Molecular Cell Biology* **22**, 6726-6734
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. und Kakimoto, T. (2004) Expression of cytokinins biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal* **37**, 128-138
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G. und Kakimoto, T. (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 16598–16603
- Mok, David W. S. und Mok, Machteld C. (2001) Cytokinin metabolism and actions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**(1), 89-118
- Mok, M. C (1994) Cytokinins: chemistry, activity, and function. in *Cytokinins: chemistry, activity, and function*, eds Mok, D W S and Mok, M C, (CRC, Boca Raton, FL), 155-166
- Mok, M.C., Mok, D.W.S., Turner, J.E. und Mujer, C.V. (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. . *Hort Science* **22**, 1194–1197
- Moore, T. C. (1979) Biochemistry and physiology of plant hormones. *Springer-Verlag*, New York
- Mothes, K. und Engelbrecht, L. (1961) Kinetin-induced directed transport of substances in excised leaves in the dark. *Phytochemistry* **1**, 58
- Mullet, J. E. (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiology* **103**, 309-313
- Mullet, J. E. und Klein, R. R. (1987) Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO Journal* **6**, 1571-1579
- Murray, M. G. und Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* **8**(19), 4321-4325
- Mýtinová, Z., Haisel, D. und Wilhelmová, N. (2006) Photosynthesis and protective mechanisms during ageing in transgenic tobacco leaves with overexpressed cytokinin oxidase/dehydrogenase and thus lowered cytokinin content. *Photosynthetica* **44**, 599-605
- Nakahira, Y., Baba, K., Yoneda, A., Shiina, T. und Toyoshima, Y. (1998) Circadian-regulated transcription of the *psbD* light-responsive promoter in wheat chloroplasts. *Plant Physiology* **118**(3), 1079-1088
- Nandi, S.K., Letham, D.S., Palni, L.M.S., Wong, O.C. und Summons, R.E. (1989) 6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Science* **61**, 189–196
- Neff, M.M., Fankhauser, C. und Chory, J. (2000) Light: an indicator of time and place. *Genes Development* **14**, 257-271

- Niyogi, K.K. (1999) PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 333-359
- Nooden, L.D. (1988a) Absciscic acid, auxin, and other regulators of senescence. In *LD Nooden, AC Leopold, eds, Senescence and aging in plants Academic Press, San Diego*, 329-369
- Nooden, L.D. (1988b) Absciscic acid, auxin, and other regulators of senescence. In *LD Nooden, AC Leopold, eds, Senescence and aging in plants Academic Press, San Diego*(329-369)
- Noodén, L.D., Guamet, J.J. und John, I. (1997) Senescence mechanisms. *Physiol Plant* **101**, 746–753
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K. und Sandberg, G. (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8039-8044
- Nováková, M., Motyka, V., Dobrev, P.I., Malbeck, J., Gaudinová, A. und Vanková, R. (2005) Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* **56**(421), 2877–2883
- Ohya, T. und Suzuki, H. (1988) Cytokinin-promoted polyribosome formation in excised cucumber cotyledons. *J Plant Physiology* **133**, 295-301
- Okada, Sachiko und Brennicke, Axel (2006) Transcript levels in plant mitochondria show a tight homeostasis during day and night. *Molecular Genetics and Genomics* **276**(1), 71-78
- Ori, N., Juarez, M.T., Jackson, D., Yamaguchi, J., Banowitz, G.M. und Hake, S. (1999) Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize homeobox gene *knotted1* under the control of a senescence activated promoter. *Plant Cell* **11**, 1073-1080
- Orozco, E.M., Chen, L.J. und Eilers, R.J. (1990) The divergently transcribed *rbcl* and *atpB* genes of tobacco plastid DNA are separated by nineteen base pairs. *Current Genetics* **17**, 65-71
- Osakabe, Y., Miyata, S., Urao, T., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002) Overexpression of *Arabidopsis* response regulators, *ARR4/ATRR1/IBC7* and *ARR8/ATRR3*, alters cytokinin responses differentially in the shoot and in callus formation. *Biochem Biophys Res Commun* **293**(2)
- Paasch, K., Lein, C., Nessiem, M. und Neumannn, H.K. (1997) Changes in the concentration of some phytochromes in cultured root explants and in intact carrot plants (*Daucus carota* L.) during the day. *Angewandte Botanik* **71**, 85–89
- Palmer, J. D. (1985) Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual Review of Genetics* **19**, 325-354
- Parthier, B. (1979) The role of phytohormones (cytokinins) in chloroplast development. *Biochem Physiol Pflanz* **174**, 173-214
- Perry, A.S., Brennan, S., Murphy, D.J., Kavanagh, T.A. und Wolfe, K.H. (2002) Evolutionary re-organisation of a large operon in adzuki bean chloroplast DNA caused by inverted repeat movement. *DNA Research* **9** (5), 157-162
- Pesaresi, P., Schneider, A., Kleine, T. und Leister, D. (2007) Interorganellar communication. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 600-606
- Pesaresi, Paolo, Masiero, Simona, Eubel, Holger, Braun, Hans-Peter, Bhushan, Shashi, Glaser, Elzbieta, Salamini, Francesco und Leister, Dario (2006) Nuclear Photosynthetic Gene Expression Is Synergistically Modulated by Rates of Protein Synthesis in Chloroplasts and Mitochondria. *Plant Cell* **18**(4), 970-991
- Pfalz, Jeannette, Liere, Karsten, Kandlbinder, Andrea, Dietz, Karl-Josef und Oelmüller, Ralf (2006) pTAC2, -6 and -12 Are Components of the Transcriptionally Active Plastid Chromosome That Are Required for Plastid Gene Expression. *Plant Cell* **18**(1), 176-197
- Pfannschmidt, Thomas, Ogrzewalla, Karsten, Baginsky, Sacha, Sickmann, Albert, Meyer, Helmut E. und Link, Gerhard (2000) The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.): Integration of

- a prokaryotic core into a larger complex with organelle-specific functions. *European Journal of Biochemistry* **267**, 253-261
- Polanská, L., Vicánková, A., Nováková, M., Malbeck, J., Dobrev, P., Brzobohaty, B., Vanková, R. und Machácková, I. (2007) Altered cytokinin metabolism affects cytokinin, auxin, and abscisic acid contents in leaves and chloroplasts, and chloroplast ultrastructure in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany* **58**(3), 637-649
- Puthiyaveetil, S., Kavanagh, T.A., Cain, P., Sullivan, J.A., Newell, C.A., Gray, J.C., Robinson, C., van der Giezen, M., Rogers, M.B. und Allen, J.F. (2008) The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *PNAS* **105**(29), 10061-10066
- Puttonen, P. und Arnott, J.T. (1994) Influence of photoperiod and temperature on growth, gas exchange, and cold hardiness of yellow cypress seedlings. *Can J For Res* **24**, 1608-1616
- Raghavendra, A.S. und Padmasree, K. (2003) Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Science* **8**, 546-553
- Rashotte, A.M., Chae, H.S., Maxwell, B.B. und Kieber, J.J. (2005) The interaction of cytokinin with other signals. *Physiol Plant* **123**, 184-194
- Rashotte, Aaron M., Carson, Susan D. B., To, Jennifer P. C. und Kieber, Joseph J. (2003) Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**(4), 1998-2011
- Rashotte, Aaron M., Mason, Michael G., Hutchison, Claire E., Ferreira, Fernando J., Schaller, G. Eric und Kieber, Joseph J. (2006) A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(29), 11081-11085
- Reski, R., Faust, M., Wang, X.-H., Wehe, M., Hader, B. und Abel, W. O. (1994) Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. *Mol Gen Genet* **244**, 353-359
- Reski, R., Wehe, M., Hader, B., Marienfeld, J. R. und Abel, W. O. (1991) Cytokinin and light quality interact at the molecular level in the chloroplast-mutant PC22 of the moss *Physcomitrella*. *J Plant Physiology* **138**, 236-243
- Richmond, A.E. und Lang, A. (1957) Effect of Kinetin on Protein Content and Survival of Detached Xanthium Leaves. *Science* **125**, 650-651
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A. und Murray, J. A. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544
- Robertson, F.C., Skeffington, A.W., Gardner, M.J. und Webb, A.A. (2008) Interactions between circadian and hormonal signalling in plants. *Plant Mol Biol*, [Epub ahead of print]
- Robson, P.R.H., Donnison, I.S., Wang, K., Frame, B., Pegg, S.E., Thomas, A. und Thomas, H. (2004) Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium* IPT gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 101-112
- Rogalski, Marcelo, Ruf, Stephanie und Bock, Ralph (2006) Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Research* **34**(16), 4537-4545
- Romanov, G. A. (1990) Cytokinins and tRNAs: a hypothesis on their competitive interaction via specific receptor proteins. *Plant Cell Environment* **13**, 751-754
- Romanov, G.A., Kieber, J.J. und Schmölling, T. (2002) A rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phospholipase D in cytokinin signalling. *FEBS Letters* **515**, 39-43
- Rosenthal, S.I. und Camm, E.L. (1996) Effects of air temperature, photoperiod and leaf age on foliar senescence of western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) in environmentally controlled chambers. *Plant Cell Environment* **19**, 1057-1065

- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I. J., Carrer, H. und Bock, R. (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology* **19**, 870-875
- Rupp, H.-M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M. und Schmülling, T. (1999) Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *The Plant Journal* **18**, 557-563
- Sakai, H., Aoyama, T. und Oka, A. (2000) *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant Journal* **24**, 703-711
- Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**(1), 431-449
- Sakakibara, H., Kasahara, H., Ueda, N., Kojima, M., Takei, K., Hishiyama, S., Asami, T., Okada, K., Kamiya, Y., Yamaya, T. und Yamaguchi, S. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *PNAS* **102**(28), 9972-9977
- Sakamoto, K. und Nagatani, A. (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant Journal* **10**, 859-868
- Salomé, P.A., To, J.P.C., Kieber, J.J. und McClung, C. R. (2006) *Arabidopsis* Response Regulators ARR3 and ARR4 Play Cytokinin-Independent Roles in the Control of Circadian Period. *Plant Cell* **18**(1), 55-69
- Sambrook, J. und Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, Naoki, Ohshima, Kimihisa, Watanabe, Ai, Ohta, Niji, Nishiyama, Yoshitaka, Joyard, Jacques und Douce, Roland (1998) Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell* **10**(5), 859-872
- Sato, Naoki und Ohta, Niji (2001) DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelope membrane. *Nucleic Acids Research* **29**(11), 2244-2250
- Satoh, Junko, Baba, Kyoko, Nakahira, Yoichi, Tsunoyama, Yuichi, Shiina, Takashi und Toyoshima, Yoshinori (1999) Developmental stage-specific multi-subunit plastid RNA polymerases (PEP) in wheat. *Plant Journal* **18**(4), 407-416
- Schaller, G.E. und Kieber, J.J. (2002) Ethylene. *The Arabidopsis Book*, 1-18
- Schrubar, H., Wanner, G. und Westhoff, P. (1990) Transcriptional control of plastid gene expression in greening *sorghum* seedlings. *Planta* **183**, 101-111
- Schweer, Jennifer, Loschelder, Heike und Link, Gerhard (2006) A promoter switch that can rescue a plant sigma factor mutant. *FEBS Letters* **580**(28-29), 6617-6622
- Serino, G. und Maliga, P. (1998) RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiology* **117**(4), 1165-1170
- Seyer, P. und Lescure, A.M. (1984) Evidence for changes in plastid mRNA populations during cytokinin-induced chloroplast differentiation in tobacco cell suspensions. *Plant Science Letters* **36**, 59-66
- Sheramet, Irena, Shahollari, Bationa, Landsberger, Martin, Westermann, Martin, Cherepneva, Galina, Kusnetsov, Victor und Oelmüller, Ralf (2004) Cytokinin stimulates polyribosome loading of nuclear-encoded mRNAs for the plastid ATP synthase in etioplasts of *Lupinus luteus*: the complex accumulates in the inner-envelope membrane with the CF₁ moiety located towards the stromal space. *Plant Journal* **38**(4), 578-593
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsabayashi, T., Zaita, N., Chungwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kasuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Todoh, N., Shimada, H. und Sugiura, M. (1986) The complete sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO Journal* **5**, 2043-2049

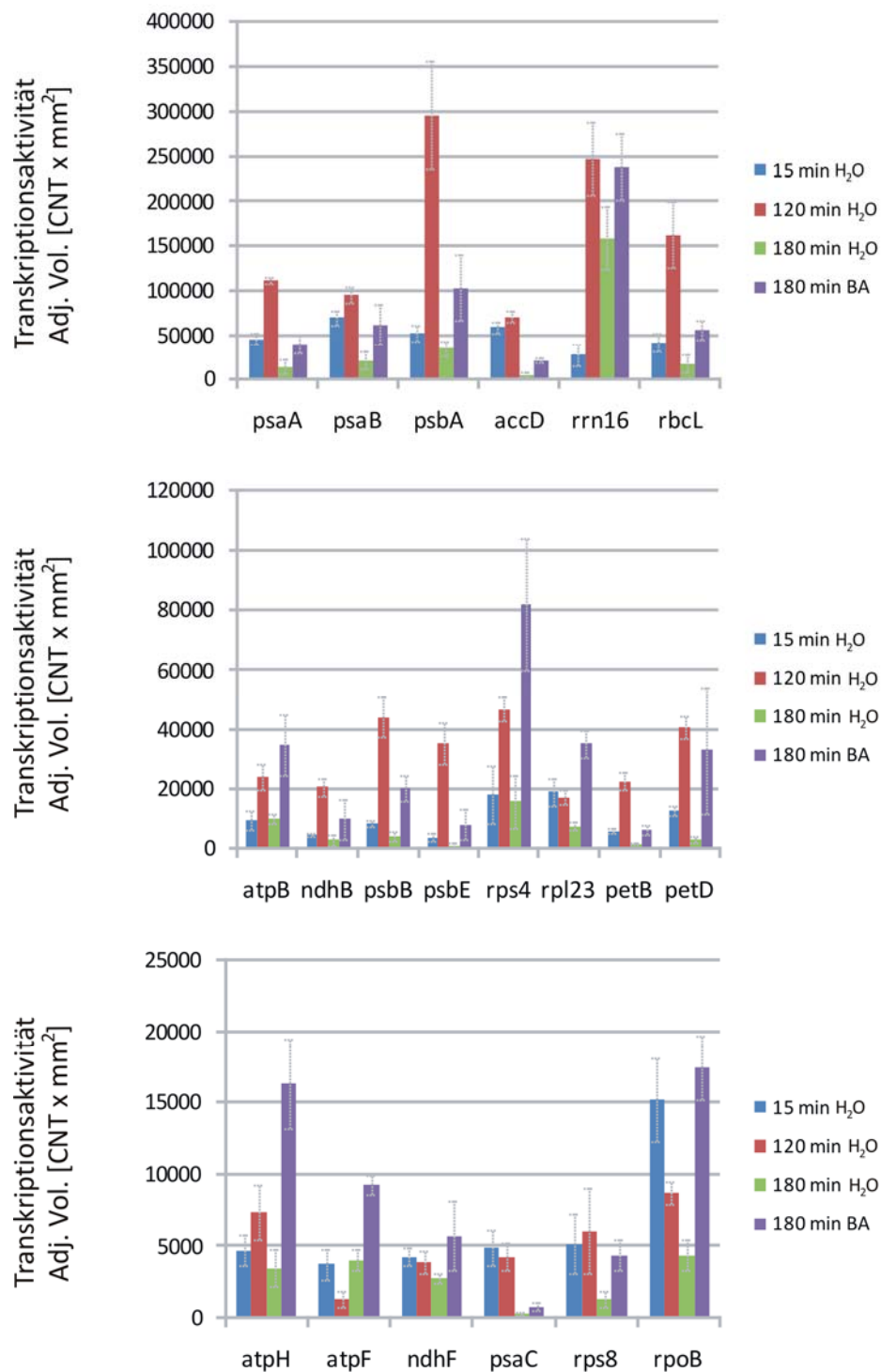
- Silhavy, D. und Maliga, P. (1998a) Mapping of the promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant. *Current Genetics* **33**, 340-344
- Silhavy, D. und Maliga, P. (1998b) Plastid promoter utilization in a rice embryonic cell culture. *Current Genetics* **34**, 67-70
- Singh, S. , Letham, D.S. und Palni, L.M.S. (1992) Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco. *Physiol Plant* **86**, 388-397
- Skoog, F. und Miller, C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* **11**, 118-131
- Smart, C. M., Scofield, S. R., Bevan, M. W. und Dyer, T.A. (1991) Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*. *Plant Cell* **3**, 647-656
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517
- Sriraman, P., Silhavy, D. und Maliga, P. (1998a) Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiology* **117**, 1495-1499
- Sriraman, Priya, Silhavy, Daniel und Maliga, Pal (1998b) The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucleic Acids Research* **26**(21), 4874-4879
- Srivastava, L.M. (2002) Plant Growth and Development: Hormones and Environment. (San Diego: CAB Academic Press)
- Stabel, Priska, Sundås, Annika und Engström, Peter (1991) Cytokinin treatment of embryos inhibits the synthesis of chloroplast proteins in Norway spruce. *Planta* **183**(4), 520-527
- Stegemann, Sandra und Bock, Ralph (2006) Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plastid genome to the nucleus. *Plant Cell* **18**(11), 2869-2878
- Stetler, D.A und Laetsch, W.M. (1965) Kinetin-induced chloroplast maturation in cultures of tobacco tissue. *Science* **149**, 1387-1388
- Stiebeling, B. und Neumann, K.-H. (1986) Identification and concentration of endogenous cytokinins in carrots (*Daucus carota* L.) as influenced by development and a circadian rhythm. *Journal Plant Physiology* **127**, 111-121
- Stock, A.M., Robinson, V.L. und Goudreau, P.N. (2000) Two component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215
- Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol Plant* **101**, 674-688
- Sugita, M. und Sugiura, M. (1996) Regulation Of Gene Expression In Chloroplasts Of Higher Plants. *Plant Molecular Biology* **32**(1-2), 315-326
- Sugiura, M. (1992) The Chloroplast Genome. *Plant Molecular Biology* **19**, 149-168
- Sugiura, M. (1995) The chloroplast genome. *Essays Biochem* **30**, 49-57
- Sun, E., Wu, B.W. und Tewari, K.K. (1989) *In vitro* analysis of the pea chloroplast 16S rRNA gene promoter. *Molecular And Cellular Biology* **9**(12), 5650-5659
- Suzuki, T., Ishikawa, K. und Mizuno, T. (2002) An Arabidopsis histidine-containing phosphotransfer (Hpt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: Overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitivity to cytokinin. *Plant Cell Physiology* **43**, 123 - 129
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H. und Mizuno, T. (2001) The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology* **42**, 107-113

- Svab, Z. und Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 913-917
- Sweere, Uta, Eichenberg, Klaus, Lohrmann, Jens, Mira-Rodado, Virtudes, Baurle, Isabel, Kudla, Jorg, Nagy, Ferenc, Schäfer, Eberhard und Harter, Klaus (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**(5544), 1108-1111
- Swiatecka-Hagenbruch, M., Emanuel, C., Hedtke, B., Liere, K. und Börner, T. (2008) Impaired function of the phage-type RNA polymerase RpoTp in transcription of chloroplast genes is compensated by a second phage-type RNA polymerase. *Nucleic Acids Research* **36**, 785-792
- Swiatecka-Hagenbruch, M., Liere, K. und Börner, T. (2007) High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics*, submitted
- Symons, G.M. und Reid, J.B. (2003) Interactions between light and plant hormones during de-etiolation. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**, 3-14
- Synková, H., Schnablová, R., Polanská, L., Hušák, M., Šiffel, P., Vácha, F., Malbeck, J., Macháčková, I. und Nebesářová, J. (2006) Three-dimensional reconstruction of anomalous chloroplasts in transgenic ipt tobacco. *Planta* **223**, 659-671
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2004) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **45**, 1053-1062
- Tanaka, K., Oikawa, K., Ohta, N., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. und Takahashi, H. (1996) Nuclear encoding of a chloroplast RNA polymerase sigma subunit in a red alga. *Science* **272**(5270), 1932-1935
- Tanaka, K., Tozawa, Y., Mochizuki, N., Shinozaki, K., Nagatani, A., Wakasa, K. und Takahashi, H. (1997) Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Letters* **413**(2), 309-313
- Teixeira-Schneider, T. (2007) Etablierung und in vivo Transkriptionsanalyse transplastomer rpoB-Promotor-Deletionsmutanten. *Diplomarbeit, HU Berlin, Berlin*
- Teramoto, H., Momotani, E., Takeba, G. und Tsuji, H. (1994) Isolation of a cDNA clone for a cytokinin-repressed gene in excised cucumber cotyledones. *Planta* **193**, 573-579
- Thiem, A. (2008) Zur Regulation der Transkription des rpoB-Operons: Herstellung und in vivo Transkriptanalysen transplastomer PrpoB-345 Promotormutanten im Tabak. *Diplomarbeit, HU Berlin, Berlin*
- Thimann, K.V. (1980) The senescence of leaves. In: *Senescence in Plants Thimann KV (ed) CRC Press, Boca Raton, FL*
- Thomas, T. H., Hare, P. D. und van Staden, J. (1997) Phytochrome and cytokinin responses. *Plant Growth Regulation* **23**(1), 105-122
- Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F. und Kozma-Bognar, L. (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 1607-1616
- Tozawa, Y., Tanaka, K., Takahashi, H. und Wakasa, K. (1998) Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue- and light-dependent expression. *Nucleic Acids Research* **26**(2), 415-419
- Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T. und Tabata, S. (2001) The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology* **42**, 751-755
- Van Staden, J., E.L., Cook und Noodén, L.D. (1988) Cytokinins and senescence. In *Senescence and aging in plants (Noodén, LD and Leopold, AC) San Diego: Academic Press*, 281-328
- Vandenbussche, Filip, Habricot, Yvette, Condiff, Amanda S., Maldiney, Regis, Straeten, Dominique Van Der und Ahmad, Margaret (2007) HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **49**(3), 428-441

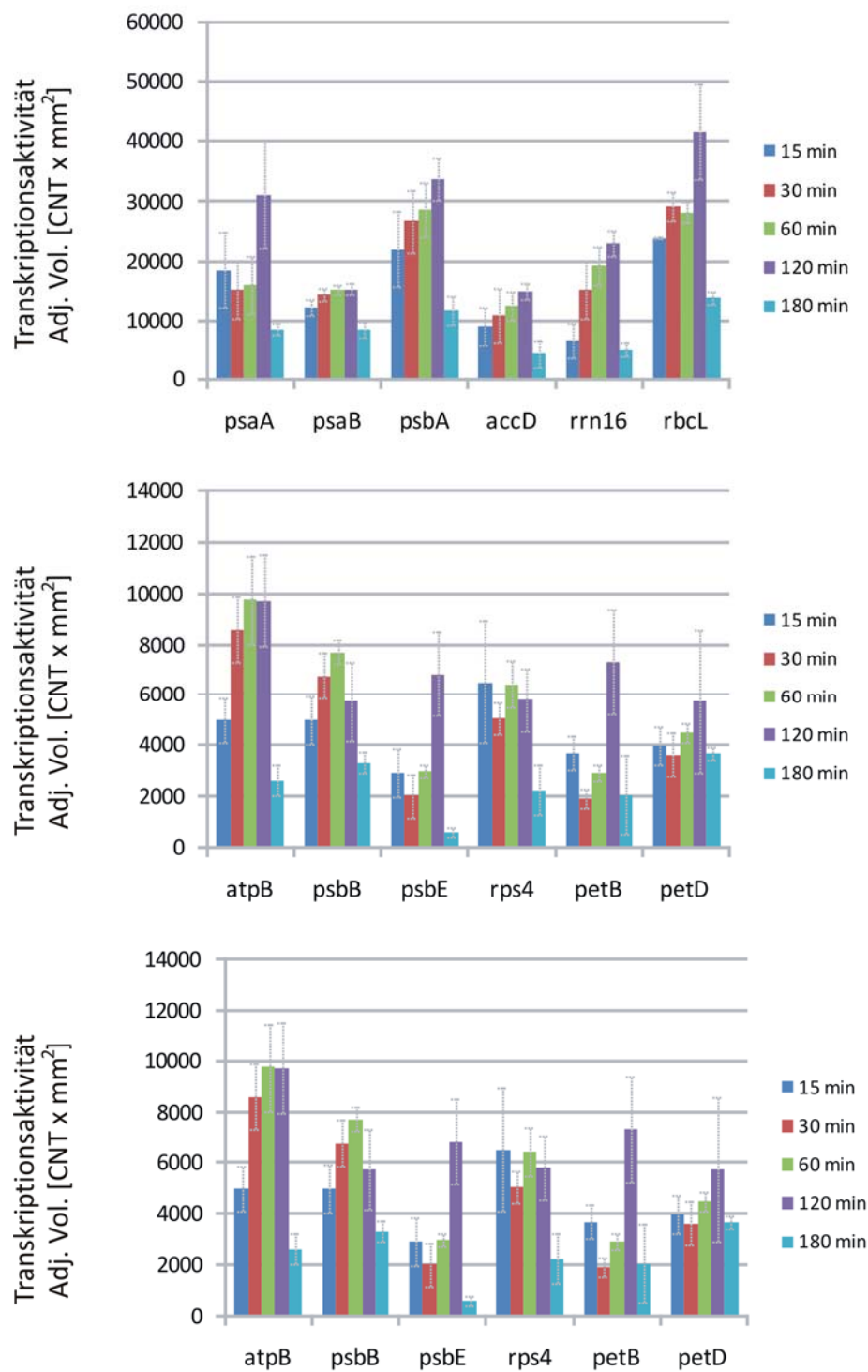
- Venglat, S.P. und Sawhney, V.K. (1996) Benzylaminopurine induces phenocopies of floral meristem and organ identity mutants in wild-type *Arabidopsis* plants. *Planta* **198**, 480-487
- Vogel, J., Axmann, I. M., Herzel, H. und Hess, W. R. (2003) Experimental and computational analysis of transcriptional start sites in the cyanobacterium *Prochlorococcus* MED4. *Nucleic Acids Res* **31**(11), 2890-2899
- Vreman, H.J., Thomas, R., Corse, J., Swaminathan, S. und Murai, N. (1978) Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia oleracea* L. leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiology* **61**, 296-306
- Wakasugi, T., Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (2001) The genomics of land plant chloroplasts: Gene content and alteration of genomic information by RNA editing. *Photosynth Res* **70**, 107-118
- Wang, Z. , Xu, Q. und Huang, B. (2004) Endogenous cytokinin levels and growth responses to extended photoperiods for creeping bentgrass under heat stress. *CROP SCIENCE* **44**, 209-213
- Weatherwax, S.C., Ong, M.S., Degenhardt, J., Bray, E.A. und Tobin, E.M. (1996) The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiology* **111**, 363-370
- Weihe, Andreas und Börner, Thomas (1999) Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends in Plant Science* **4**(5), 169-170
- Weiler, E. W. (2003) Sensory principles of higher plants: Plant Biochemistry. *In Angew Chem Int Ed, Wiley-VCH Verlag, Weinheim*, , 392-411
- Werner, T., Holst, K., Pörs, Y., Guivarc'h, A., Mustroph, A., Chriqui, D., Grimm, B. und Schmölling, T. (2008) Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany* **59**(10), 2659-2672
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H. und Schmölling, T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**(11), 2532-2550
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M.H. und Schmölling, T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10487-10492
- Whatley, J. M. (1993) The endosymbiotic origin of chloroplasts. *Int Rev Cytol* **144**, 259-299
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. und Ausubel, F.M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565
- Woeste, K.E., Vogel, J.P. und Kieber, J.J. (1999) Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Physiologia Plantarum* **105** 478-484
- Wycliffe, Paul, Sitbon, Folke, Wernersson, Jonny, Ezcurra, Ines, Ellerstrom, Mats und Rask, Lars (2005) Continuous expression in tobacco leaves of a *Brassica napus* PEND homologue blocks differentiation of plastids and development of palisade cells. *Plant Journal* **44**(1), 1-15
- Yakovleva, L. A., Klueva, N. Y. und Kulaeva, N. O. (1992) Phosphorylation of ribosome proteins as a mechanism of phytohormone regulation of protein synthesis in plants. In Kamínek, M., Mok, D. W. S., Zazimalová (eds.) *Physiology and biochemistry of cytokinins in plants. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands*, 169-172
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T. und Mizuno, T. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017-1023
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review Plant Biology* **57**, 781-803

- Yang, J., Zhang, J., Wang, W., Zhu, Q. und Liu, L. (2002a) Absciscic acid and cytokinin in the root exudates and leave an their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* **215**, 645-652
- Yang, J., Zhang, J., Wang, W., Zhu, Q. und Liu, L. (2002b) Absciscic acid and cytokinin in the root exudates and leave an their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta* **215**(645-652)
- Yu, X., Sukumaran, S. und Marton, L. (1998) Differential expression of the Arabidopsis Nial and Nia2 genes: Cytokinin-induced nitrate reductase activity is correlated with increased Nial transcription and mRNA levels. *Plant Physiology* **116**, 1091-1096
- Zapata, J. M., Guera, A., Esteban-Carrasco, A., Martin, M. und Sabater, B. (2005) Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic *ndhF*-defective tobacco. *Cell Death Differ* **12**(10), 1277-1284
- Zavaleta-Mancera, H.A., Franklin, K.A. , Ougham, H.J. , Thomas, H. und Scott, I.M. (1999a) Regreening of senescent Nicotiana leaves. I. Reappearance of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase and light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1677-1682
- Zavaleta-Mancera, H.A., Thomas, B.J., Thomas, H. und Scott, I.M. (1999b) Regreening of senescent Nicotiana leaves. II. Redifferentiation of plastids. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1683-1689
- Zhang, R., Zhang, X., Wang, J., Letham, D.S., McKinney, S.A. und Higgins, T.J.V. (1995) The effect of auxin on Cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue expressing an *ipt* gene. *Planta* **196**, 84-94
- Zheng, B., Deng, Y., Mu, J., Ji, Z., Xiang, T., Niu, Q-W., Nhua, N.-H. und Zuo, J. (2006) Cytokinin affects circadianclock oscillation in a phytochrome B- and Arabidopsis response regulator 4-dependent manner. *Physiologia Plantarum* **127**, 277-292
- Zoschke, R., Liere, K. und Börner, T. (2007) From seedling to mature plant: *Arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *Plant Journal* **50**(4), 710-722
- Zubo, Y. O. , Selivankina, S. Y., Yamburenko, M. V., Zubkova, N. K., Kulaeva, O. N. und Kusnetsov, V. V. (2005) Cytokinins activate transcription of chloroplast genes. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **400**(1), 48-51
- Zubo, Y.O., Yamburenko, M.V., Selivankina, S.Y., Shakirova, F.M., Avalbaev, A.M., Kudryakova, N.V., Zubkova, N.K., Liere, K., Kulaeva, O.N., Kusnetsov, V.V. und Börner, T. (2008) Cytokinins stimulate chloroplast gene transcription in detached barley leaves. *Plant Physiology* **148**, 1082-1093

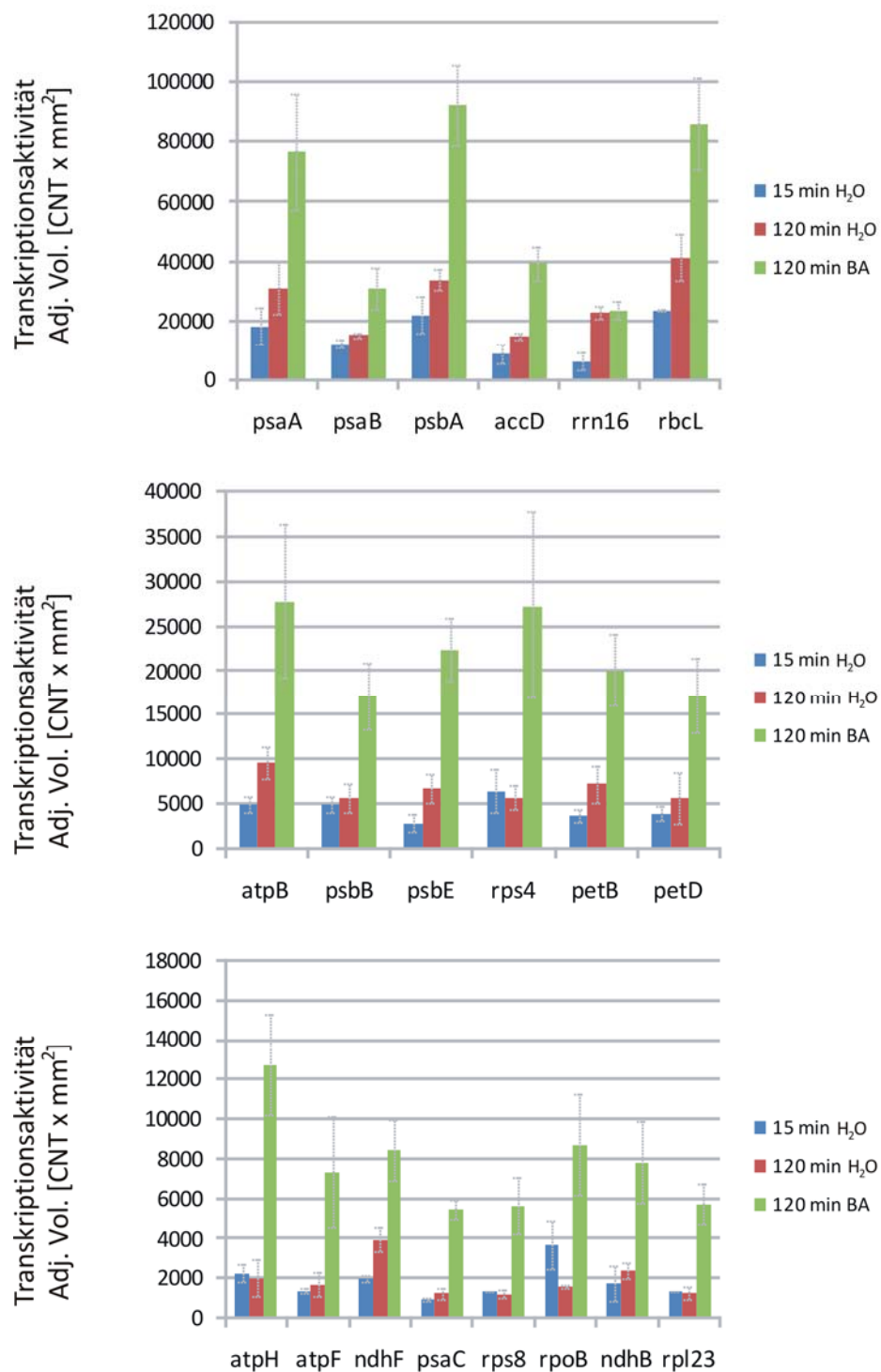
ANHANG



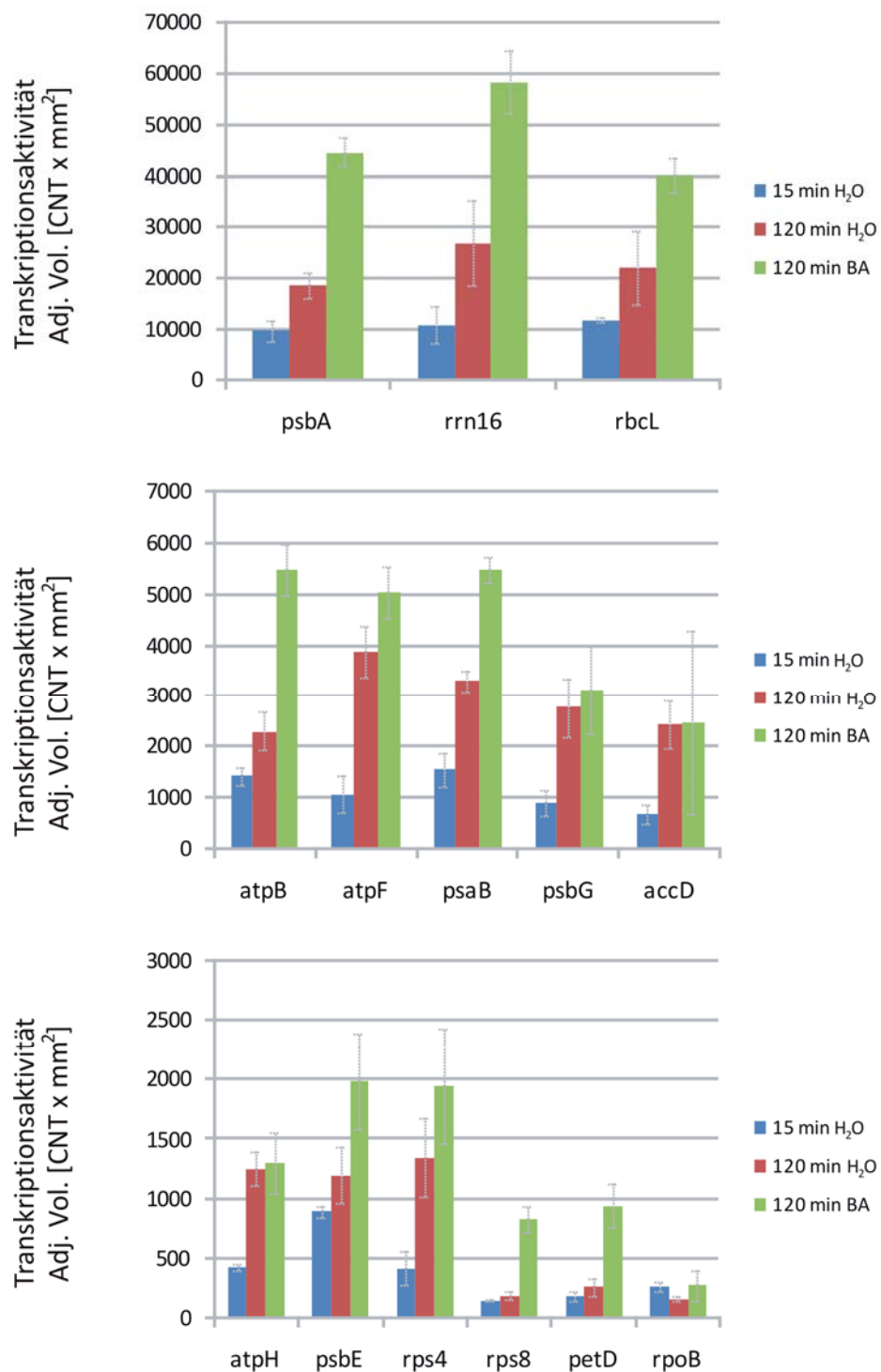
A 1: Aktivierung der plastidären Transkription in abgeschnittenen Blättern 12-Wochen-alter Tabakpflanzen. Gezeigt sind die Transkriptionsraten in den Kontrollen nach 15, 120 und 180 min Inkubation in Wasser sowie in den BA-behandelten Tabakblättern 180 min nach Cytokininzufuhr (Abbildung 3.2). Gezeigt sind die Mittelwerte der Transkriptionsaktivität aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SA.



A 2: Transkriptionsaktivität in den Chloroplasten von sieben-Tage-alten Tabakpflanzen. Tabaksamen wurden sieben Tage in flüssigem $\frac{1}{2}$ MS-Medium angezogen, darauffolgend für 15, 30, 60, 120 und 180 min in Wasser inkubiert (siehe auch Abbildung 3.5). Gezeigt sind die Mittelwerte der Transkriptionsaktivität aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SA.



A 3: Aktivierung der plastidären Transkription in sieben-Tage-alten Tabakpflanzen nach 120 min BA-Behandlung. Gezeigt sind die Transkriptionsraten in den Kontrollen nach 15 und 120 min Inkubation in Wasser sowie in den BA-behandelten Tabakpflanzen 120 min nach Cytokininzufuhr (Abbildung 3.5). Gezeigt sind die Mittelwerte der Transkriptionsaktivität aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SA.



A 4: Aktivierung der plastidären Transkription in sieben-Tage-alten Arabidopsis-Pflanzen nach 120 min BA-Behandlung. Gezeigt sind die Transkriptionsraten in den Kontrollen nach 15 und 120 min Inkubation in Wasser sowie in den BA-behandelten Tabakpflanzen 120 min nach Cytokininzufuhr (Abbildung 3.11). Gezeigt sind die Mittelwerte der Transkriptionsaktivität aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SA

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Thomas Börner möchte ich mich für das interessante Dissertationsthema bedanken.

Vor allem danke ich aber allen, die am Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. So möchte ich als erstes meinen Eltern danken, die mich während meines Studiums und der Doktorandenzeit in jeder Hinsicht unterstützt haben. Ich weiß, Ihr habt es nicht immer leicht mit mir. – Es ist schön zu wissen, dass Ihr immer für mich da seid.

Ein besonderer Dank gilt Karsten Liere für die Betreuung, den gedanklichen Austausch und die ständige Hilfsbereitschaft während der Doktorarbeit.

An die (Ex-)Mito-Leute: Ein dickes Dankeschön an jeden von Euch für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft. Die gemeinsame Zeit mit Euch war sehr schön. Sie wird mir immer in fröhlicher Erinnerung bleiben. Monika Swiatecka-Hagenbruch danke ich zudem besonders für ihre Offenheit, stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden zu haben.

I thank Yan Zubo a lot for scientific discussions.

Ich möchte mich auch bei Jana Dörschel und Karen Göldner für ihre Motivation bedanken. Wenn ich nicht mehr weiter wusste, habt Ihr mich immer wieder aufgebaut. ICH DANK‘ EUCH!! Außerdem vielen, vielen Dank für Dein kritisches Korrekturlesen, Karen!!

Ilka Axmann bin ich überaus dankbar, dass sie mir die Zeit für das Beenden dieser Dissertation gegeben hat.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, 25. März 2009

